Postverlagsort Berlin

PLANTA

ARCHIV FÜR WISSENSCHAFTLICHE BOTANIK

BEGRÜNDET VON **W. RUHLAND** UND **H. WINKLER**

UNTER MITWIRKUNG VON
J. BONNER-PASADENA, **A. ERNST**-ZÜRICH
H. v. GUTTENBERG-ROSTOCK, **R. HARDER**-GÖTTINGEN, **O. RENNER**-MÜNCHEN
W. RUHLAND-UNTERDEUFSTETTEN, **W. SCHUMACHER**-BONN

HERAUSGEGEBEN VON
L. BRAUNER MÜNCHEN
E. BÜNNING TÜBINGEN

52. BAND, 2. HEFT
MIT 54 TEXTABBILDUNGEN
(ABGESCHLOSSEN AM 6. OKTOBER 1958)

SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
1958

Planta (Berl.)

Preis DM 25.80

Planta. Archiv für wissenschaftliche Botanik

Begründet 1925. Band 1—34 (1945) herausgegeben von *W. Ruhland* und *H. Winkler*. (Band 1—21, 1934, als „Zeitschrift für wissenschaftliche Biologie", Abteilung E). Band 35—47. Herausgegeben von *W. Ruhland* und *O. Renner*. Band 48—51. Herausgegeben von *W. Ruhland, L. Brauner* und *E. Bünning*

Die Zeitschrift „Planta", Archiv für wissenschaftliche Botanik, steht in deutscher Sprache oder einer der Kongreßsprachen, sofern sie die Muttersprache des Autors ist, abgefaßten Originalarbeiten aus dem Gesamtgebiet der Botanik, abgesehen von solchen rein systematischen oder floristischen Inhalts, offen.

Arbeiten, welche einen Vermerk des Verfassers „Kurze Mitteilung" tragen, werden sobald wie möglich außerhalb der Reihenfolge des Eingangs abgedruckt. Ihr Umfang darf 4 Druckseiten nicht überschreiten; die Beigabe von Abbildungen ist nur in Ausnahmefällen angängig.

Die Zeitschrift erscheint zur Ermöglichung raschester Veröffentlichung zwanglos in einzeln berechneten Heften, die zu Bänden vereinigt werden.

Der Autor erhält einen Unkostenersatz von DM 20.— für den 16seitigen Druckbogen, jedoch im Höchstfalle DM 40.— für eine Arbeit. Für „Kurze Mitteilungen" wird ein Unkostenersatz nicht erstattet.

Es wird ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht, daß mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder an den Verlag übergeht. Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind, und die auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen der Autor sich verpflichtet.

Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme, Mikrophotographien u. ä. von den Zeitschriftenheften, von einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen.

Die Mitarbeiter erhalten von ihrer Arbeit bis auf weiteres zusammen 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Aufnahmebedingungen siehe 3. Umschlagseite.

Alle Manuskripte und Anfragen sind zu richten an

Professor Dr. Leo Brauner, München 19, Menzingerstr. 67, Botanisches Institut der Universität, oder an

Professor Dr. Erwin Bünning, Tübingen, Botanisches Institut der Universität, Wilhelmstraße 5.

Springer-Verlag

Berlin-Wilmersdorf, Heidelberger Platz 3, Fernsprecher 830301

und

Heidelberg, Neuenheimer Landstr. 28—30, Fernsprecher 2790 1

---

52. Band **Inhaltsverzeichnis** 2. Heft

Seite

Resch, A., Weitere Untersuchungen über das Phloem von Vicia faba. Mit 17 Textabbildungen 121

Heber, U., Ursachen der Frostresistenz bei Winterweizen. I. Mitteilung: Die Bedeutung der Zucker für die Frostresistenz. Mit 15 Textabbildungen 144

Linser, H., O. Kiermayer und E. Youssef, Der Wuchsstoffgehalt verschiedener Brassica-Pflanzen in Abhängigkeit von ihrem Entwicklungszustand. Mit 4 Textabbildungen 173

Winter, E., Bildung eines roten Farbstoffes in verletztem Pflanzengewebe. Mit 3 Textabbildungen 187

Jeremias, K., Über den Jahresgang einiger Zucker in den Blättern von Hedera helix L. Mit 3 Textabbildungen 195

Haccius, B., und W. Schneider, Untersuchungen zur Stadienspezifität des teratogenen Effektes der 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure bei Galium aparine. Mit 12 Textabbildungen 206

Napp-Zinn, K., Vernalisation und Thermoperiodismus. Kurze Mitteilung . . 229

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Planta, Bd. 52, S. 121—143 (1958)

Aus dem Botanischen Institut der Universität Freiburg i. Br.

WEITERE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS PHLOEM VON VICIA FABA

Von

ARMIN RESCH

Mit 17 Textabbildungen

(Eingegangen am 24. April 1958)

A. Einleitung

In einer vorausgehenden Arbeit ist die Entwicklungsgeschichte der Siebröhrenglieder und Geleitzellen von *Vicia faba* beschrieben worden (RESCH 1954)[1]. Die Beobachtungen wurden an Karminessig-Quetschpräparaten gemacht, die in mehrfacher Hinsicht von Vorteil sind und wichtige Ergebnisse vermitteln.

So war es vor allen Dingen möglich, an nicht angeschnittenen Zellen das Schicksal des Zellkerns in den Siebröhren zu beschreiben, ohne daß mit Täuschungen gerechnet werden mußte, wie sie bei Betrachtung von Schnittpräparaten immer wieder vorkommen.

Die bisherigen Ergebnisse sind folgende: Die Teilung, die aus der Siebröhrenmutterzelle das Siebröhrenglied und die zugehörige Geleitzelle bzw. die Geleitzellen herstellt, ist ihrem Effekt nach inäqual. Sie entbehrt aber der sonst als typisch angesehenen äußeren Merkmale einer inäqualen Zellteilung, da weder Plasma noch Kern Dichteunterschiede während oder direkt nach der Teilung aufweisen. Diese werden erst im Verlauf der Zelldifferenzierung nach und nach ausgebildet, was sich zu erkennen gibt, wenn man die Entwicklung der *beiden* Tochterzellen weiter verfolgt. Am Ende der Entwicklung steht einerseits eine stark plasmahaltige, mit hyperchromatischem, großem Kern versehene Geleitzelle und andererseits eine mit dünnem Plasmabelag versehene *kernlose* Zelle, das Siebröhrenglied. Zwischen beiden Zellen existiert ein enger cytoplasmatischer Konnex, der auch bei der Maceration diese zusammenhält und zur gemeinsamen morphogenetischen Beschreibung geradezu herausfordert.

Aus diesen Beobachtungen wurde unter Berücksichtigung anderer physiologischer und anatomischer Befunde folgendes geschlossen: Die Geleitzelle ist nicht nur ein Attribut der Siebröhre. Sie hat eine entwicklungsmechanische Bedeutung und sorgt dann für die Erhaltung des lebenden Zustandes in der kernlosen Siebröhre durch eine Fernwirkung

[1] Zusammen mit vorliegender Veröffentlichung erster Teil einer Habilitationsschrift der Naturw.-Mathem. Fakultät der Albert Ludwig-Universität Freiburg i. Br.

ihres Zellkernes. Ebenso steht auch der Callose-Formwechsel in der Siebröhre unter dem Einfluß dieser Zellen oder ihrer Kerne (s. auch STRASBURGER 1891). Außerdem ist die Morphologie der Geleitzelle ein Ausdruck ihres stoffwechselaktiven Zustandes (Drüsencharakter).

Die anatomische und physiologische Erforschung des Phloems kann keineswegs als abgeschlossen betrachtet werden (ESAU, CURRIER und CHEADLE 1957, HUBER 1956). In neuerer Zeit sind Arbeiten erschienen, die uns erlauben, konkretere Vorstellungen über die Physiologie der Siebröhren zu entwickeln, wenn auch noch nicht die letzte Entscheidung über den Transportmechanismus gefallen ist. Wir kennen die Zusammensetzung des Siebröhrenausflusses bei einer ganzen Reihe geeigneter Objekte (WANNER 1953a, b, ZIEGLER 1956). Der zellphysiologische Zustand der Siebröhren (Plasmolyse) ist unter Beachtung sorgfältiger Präparation untersucht worden (CURRIER, ESAU und CHEADLE 1955). In den Geleitzellen, die eine hohe Phosphataseaktivität zeigen, die den Siebröhren aber fehlt, erfolgt die Dephosphorylierung und Rephosphorylierung bei der Abgabe und Entnahme des Zuckers (BAUER 1953, WANNER 1952). Modellobjekte für diese Vorgänge in den Geleitzellen sind die Nektardrüsen (ZIEGLER 1956, ZIMMERMANN 1953, 1954). Auch durch anatomische Untersuchungen ist das Geleitzellenproblem neu behandelt worden (ESAU und CHEADLE 1955, HUBER und GRAF 1955).

Die vorliegenden Untersuchungen sind weitere Beobachtungen zur Entwicklungsgeschichte und zum Status der Siebröhren und Geleitzellen. Das Objekt ist *Vicia faba* geblieben, aber es wurden andere Methoden hinzugezogen. Die Möglichkeiten einer moderneren lichtmikroskopischen Analyse des Phloems, im speziellen der Siebröhren und Geleitzellen, sind aber noch längst nicht ausgeschöpft.

B. Material und Methode

Die Untersuchungen wurden an Freilandpflanzen von *Vicia faba* (FRANKS Hohenloher Ackerbohne 4/10/5)ausgeführt. Meistens wurde zur Herstellung der Präparate dieselbe Methode angewendet, wie sie auf S. 77 und 78 der „Beiträge zur Cytologie des Phloems", Planta Bd. 44, beschrieben wurde. Sie sei kurz wiederholt: Fixierung in Alkohol-Eisessig oder Flemming. Färbung in Essigkarmin 0,5%. Hinzugekommen sind noch folgende Methoden: Zur Erkennung *aller* Bestandteile der untersuchten Zellen (Differenzierung zwischen Nucleolen und Chromozentren, Plasmakonfiguration, Eiweißkörper und Virusspindeln) ist eine *Gegenfärbung* mit Fastgreen FCF (Bayer) oder Lichtgrün (Merck), gelöst in Wasser oder Essigsäure (50%), 0,1—1 g pro 100 cm^3 Flüssigkeit von größtem Vorteil. Das fertige Karminquetschpräparat wurde entweder mittels Durchsaugen der grünen Farblösung oder durch Eintauchen des ganzen Objektträgers gegengefärbt. Durch tropfenweise Zugabe von wäßrig gelösten Einschlußmitteln wie Gelatinol (Chroma) oder Celodal (Bayer) lassen sich dann Dauerpräparate herstellen. Nimmt man als Lösungsmittel für die Gegenfärbung Alkohol, so kann über Xylol in Caedax, Eukitt oder in einem anderen derartigen Mittel eingeschlossen werden. *Feulgen-Nuclealreaktion:* Flemming-fixiertes Material (24 Std), 20 min Hydrolyse in n-HCl von 60° C. Schiffsches

Reagens mit Rosanilin (Merck 7603) ca. 3 Stunden. Nach Bleichen in SO_2-Wasser (3× eine Minute) und anschließender Wässerung (10 Minuten) zerteilen und quetschen der Schnitte in Wasser! (Die zum Quetschen oft empfohlene 50%ige Essigsäure entfärbt die Kerne nach einiger Zeit.) Auch die Feulgen-Präparate wurden wie Karminpräparate gegengefärbt. *Paraffinschnitte:* Diese Methode diente hauptsächlich zur Untersuchung der histologischen Zusammenhänge. Darüber wird in einer weiteren Veröffentlichung eingehend berichtet. Hier sind nur die cytologisch-entwicklungsgeschichtlichen Beobachtungen aus den Mikrotomschnitten behandelt. Ein Vergleich der modernen Quetschmethode mit der bisherigen Untersuchungsmethode des Phloems war notwendig. Die Anzahl auswertbarer Präparatstellen steht aber bei der Schnittmethode in keinem Verhältnis zur aufgewendeten Arbeit, vor allen Dingen, wenn es sich um die Darstellung der Beziehung von Geleitzellen und Siebröhren, der Unterscheidung von Phloemparenchym und Geleitzellen und um eine vollständige Diagnose der cytologischen Strukturen handelt. Fixierung Formalin-Essigsäure-Alkohol (Johansen 1940, p. 41), Hochführen und Paraffineinbettung wie üblich. Färbung mit Safranin-Fastgreen (nach Johansen) oder Flemmingsche Dreifachfärbung oder Hämatoxylin nach Ehrlich mit Eosingegenfärbung (Romeis 1948). Auch bei den Paraffinschnitten wurde die Feulgen-Nuclealreaktion angewendet, zum Teil mit Gegenfärbung nach Tomasi oder nach Semmens-Bhaduri (siehe LaCour 1947, p. 227). Auch die von Esau 1948 empfohlene Resorcinblau-Bismarckbraun-Jodgrün-Färbung wurde ausgeführt.

Versuche, ungeschrumpfte Präparate mit einem der neuen wasserlöslichen Einbettungsmittel (Cremolan oder Aquaffin) zu erhalten, waren nicht immer erfolgreich. Es ist sehr schwer, bei der Überführung in das Einbettungsmittel Veränderungen und Schrumpfungen der Objekte zu vermeiden. Ferner ist die Herstellung von Schnittbändern bzw. deren Aufkleben nicht mit derselben Sicherheit wie bei Paraffinschnitten möglich.

C. Beobachtungen

I. Die Anzahl der Geleitzellen pro Siebröhrenglied

Die ersten Siebröhren, die in der jungen Sproßachse nachzuweisen sind, besitzen ungeteilte Geleitzellen. Diese Siebprimanen entstehen in einer Zone lebhaften Teilungs -und Streckungswachstums und eilen allen übrigen Elementen in der Entwicklung voraus. Sie haben von allen noch zu beschreibenden Siebröhrentypen zu Beginn der Entwicklung die kürzesten und ausgewachsen die längsten Siebröhrenelemente, erfahren also bei der Entwicklung eine Streckung um das Vielfache ihrer Ausgangsgröße. So extrem ihr Streckungswachstum ist, so kurz ist ihre Lebensdauer. Sowie neue Siebröhren zu ihrer Ablösung entstanden sind, verlieren sie ihren Turgor und werden eingedrückt, sie obliterieren und kollabieren. Ein Teil ihres erreichten Längenzuwachses ist möglicherweise passiv (Esau 1953, p. 286). Die Kerne der Geleitzellen werden entsprechend der starken Zellstreckung sehr lang, fast fadenförmig (bis ca. 80 μ).

Auch die zuerst gebildeten Metaphloemsiebröhren haben meist ungeteilte Geleitzellen (Einergeleitzellen) wie die Primanen. Die Zone des Übergangs zum sekundären Wachstum ist durch etwa gleichen Anteil von Einer- und Zweiergeleitzellen gekennzeichnet. Die Querteilung

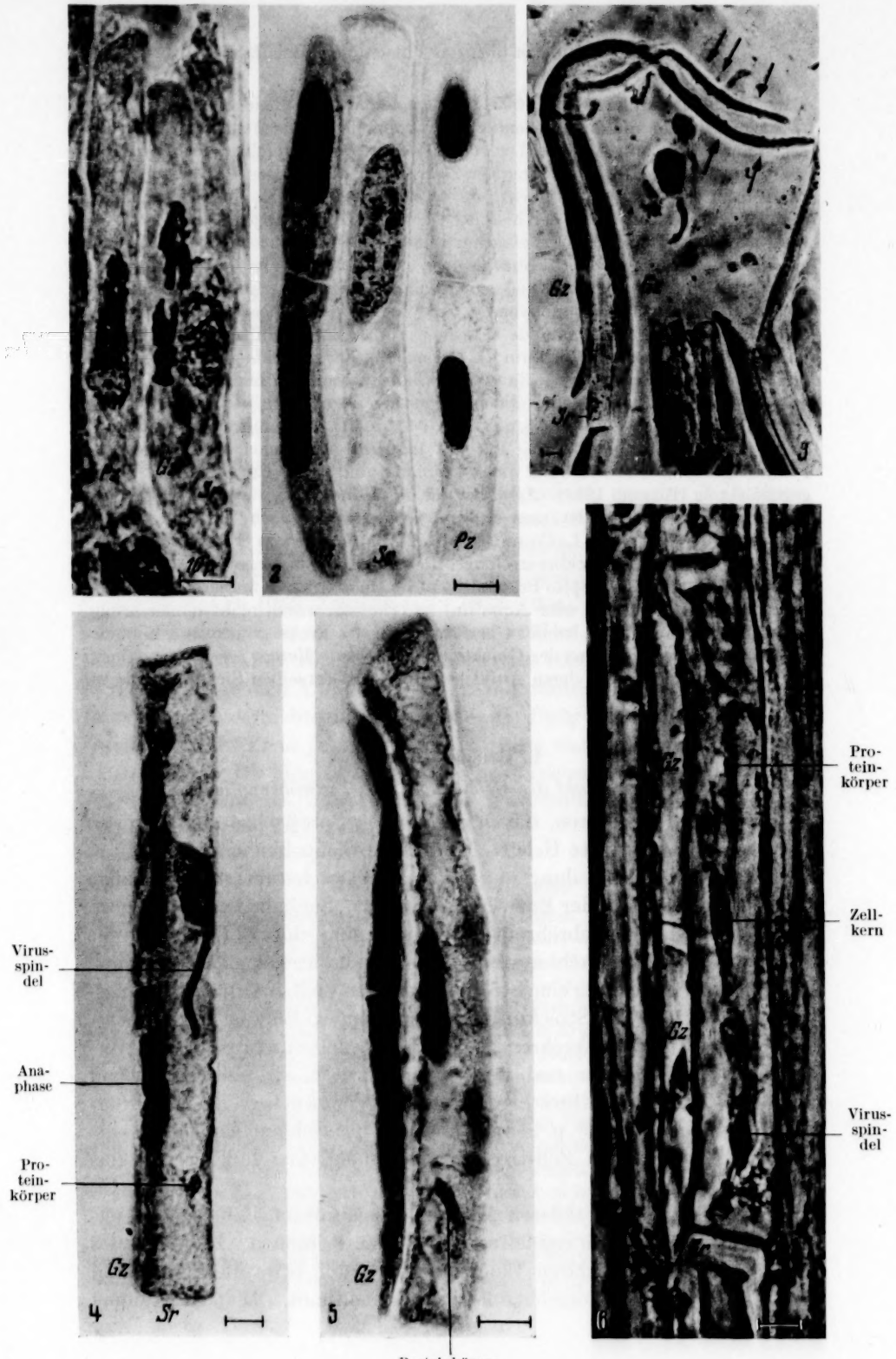


Abb. 1—6, Unterschrift s. S. 125

(äquale Zellteilung in der Geleitzelle) konnte jetzt beobachtet werden. Die betreffenden Stadien wiesen bereits deutliche Plasmaunterschiede zwischen Geleitzelle und Siebröhrenglied auf, dessen Kern dann schon zu verblassen beginnt oder sogar deutliche Auflösungserscheinungen zeigt (Abb. 1). Die Mitose in der Geleitzelle wird also erst durchgeführt, wenn die Differenzierungsvorgänge im Siebröhrenglied in vollem Gange sind, sie schließt demnach nicht direkt an die inäquale Mitose an, wie das z. B. bei Bildung und Teilung der Spezialmutterzelle während der Spaltöffnungsentwicklung der Fall ist.

In der Streckungszone wurden auch Siebröhren gefunden, die von drei- bis vierfach unterteilten Geleitzellen je Siebröhrenglied flankiert waren. Die Bildung des Vierzellenstadiums erfolgt ebenfalls zur Zeit der Siebröhren-Chromatolyse, offenbar durch eine asynchrone Teilung im Zweizellenstadium der prospektiven Geleitzelle (Abb. 4). Die Siebröhrenglieder von Dreier- und Vierergeleitzellen sind bezeichnenderweise immer länger als die mit Zweiergeleitzellen. Diese zuletzt besprochenen Geleitzellentypen treten zwar schon in jüngeren Sproßteilen auf. Da aber die blatteigenen Gefäßbündel den stammeigenen im primären *und* sekundären Wachstum weit voraus sind und die Zugehörigkeit im Quetschpräparat schwer festzustellen ist, kann nicht sicher gesagt werden, ob die mehrfach unterteilten Geleitzellen *nur* aus dem sekundären Phloem stammen. Mikrotomschnitte durch ältere Internodien zeigen aber im primären Phloem Einergeleitzellen und gelegentlich unterteilte Geleit-

Abb. 1—6. Primäre und sekundäre Siebröhren, Geleitzellen und Parenchymzellen der Sproßachse von *Vicia faba*. 1—5: Essigkarmin-Maceration. 6: Mikrotomschnitt, Safranin-Fastgreen

Abb. 1. Anaphase des diploiden Zellkerns führt zur Unterteilung der Geleitzelle (*Gz*). Rechts davon der bereits in Chromatolyse begriffene Zellkern des zugehörigen Siebröhrengliedes (*Sr*). (Vgl. Kernstruktur der Parenchymzelle, *Pz*)

Abb. 2. Zellgruppe aus dem Metaphloem (Übergang zum Sekundärtyp). Die Geleitzellenkerne mit endomitotischer Feinstruktur, wegen Hyperchromasie in der photographischen Darstellung nicht so deutlich, vgl. jedoch Abb. 8 und 9. Der *Sr*-Kern wie heterochromatisch. Plasma, Kern und Zellform-Unterschiede! Vgl. Abb. 7

Abb. 3. Primäre Siebröhre mit 2 gleichartigen, ungeteilten, hyperchromatischen Geleitzellen. Die „Überkreuzung" kann durch die Präparation verursacht sein. Interessant die Plasmazapfen der Geleitzellen, die die Tüpfel der *Sr* durchsetzen (Pfeile). In der *Sr* kleine Plastiden (Stärke!). Phako

Abb. 4. Sekundäres Siebröhrenglied mit 4fach unterteilter Geleitzelle. Der untere Zellkern noch in früher Anaphase. *Sr*-Kern oval, relativ klein, aber wieder mit Chromozentrenstruktur. Der Nucleolus hier dunkel gefärbt (Lichtgrün). Die Virusspindel (Nadel) am unteren Ende gespalten

Abb. 5. Sekundäres Siebröhrenglied mit 2fach unterteilter *Gz*. Dazwischen die gequollene Zellwand (durch Glycerineinbettung übertrieben). In der *Gz* karminpositive extranucleäre Partikel

Abb. 6. Eine der Abb. 5 entsprechende *Sr* im Paraffin-Mikrotomschnitt. Sekundärphloem-Radialschnitt. Der Zellkern des oberen Geleitzellenfaches nicht in der Schnittebene; Links von der Gz primäre Metaphloem-Sr (schiefe Endwand, engeres Lumen; möglicherweise ohne Zellkern?). Rechts im Bild liegt das Cambium. Phako. — Der Abbildungsmaßstab ist wie in allen folgenden Abbildungen (außer dem Schema Abb. 7) durch eine vor der Reproduktionsverkleinerung eingezeichnete Marke angegeben, deren Länge immer der Strecke von 10 μ entspricht; so ist z. B. Abb. 1 im Verhältnis 800:1 wiedergegeben

zellen, im sekundären Phloem ausschließlich zwei- bis vierfach unterteilte Geleitzellen, wie im Bast von *Robinia* (HUBER 1939).

Es ist also festzustellen: Die nicht unterteilte Einergeleitzelle ist die spezielle Differenzierungsform des Protophloems und die häufigere des primären Phloems (Primanen- oder Primärtyp). Die Zweier-, Dreier- und Vierergeleitzellen finden sich speziell bei den aus dem Cambium hervorgegangenen Siebröhren des sekundären Phloems (Sekundärtyp). Das Metaphloem des primären Dickenwachstums vermittelt zwischen beiden Typen der Geleitzellendifferenzierung (Abb. 1—7, 15, 17). In Organen mit ausschließlich primärem Phloem wie Funiculus und Blatt herrscht der Primanentyp vor (RESCH 1954).

II. Die Unterscheidung von Geleitzellen und Siebparenchymzellen

Es gibt Siebröhren, die nicht nur von einer Geleitzelle oder Geleitzellreihe flankiert werden, sondern auch auf der anderen Seite eine ähnliche Zelle besitzen, die ebenso fest anliegt (Abb. 3, 7, 12). Daraus wird geschlossen, daß diese zweite Geleitzelle in genetischer und auch physiologischer Beziehung zur Siebröhre steht, d.h. sie ist aus derselben Siebröhrenmutterzelle durch eine zweite inäquale Zellteilung entstanden. Diese ist in jungen Stadien, die noch keine Plasmadifferenz zeigen, zu finden. (Aufeinanderfolgende inäquale Zellteilungen als gelegentliche Erscheinung fanden BÜNNING und BIEGERT (1953) auch bei der Spaltöffnungsentwicklung von *Allium cepa*, sowie ZEPF (1952) bei der Differenzierung des *Sphagnum*blattes.) Der Charakter der zweiten Geleitzelle entspricht oft dem der ersten oder eine der beiden erscheint weniger stark gefärbt. Wir nannten sie „Nebengeleitzelle" (Planta 44, p. 80, Abb. 2c). Der Grad der Unterteilung (Fächerung) der Geleitzellen spielt für die Plasmadichte und sonstigen Eigenschaften keine Rolle. Genau so oft gibt es beidseitig angeschlossen Geleitzellen ohne erkennbaren Plasmaunterschied.

Außerdem findet man in den Quetschpräparaten noch eine andere Zellsorte, die in den jüngeren Entwicklungsstadien ebenfalls dem Siebröhrenglied zugeordnet ist (Abb. 1, 2, 7). Beim primären Phloem oft schwer von Geleitzellen zu unterscheiden, sind die Merkmale dieser Zellen im sekundären Phloem in mehreren Punkten von denen der Geleitzellen verschieden: 1. geringere — man möchte sagen normale — Plasmadichte, 2. quere oder schräge (jedenfalls stumpfe) Zellenden und 3. Zellkern nicht hyperchromatisch und mit ovalem oder rundem Umriß, auch bei nicht unterteilten Zellen. Mit diesen Eigenschaften sind die Phloemparenchymzellen charakterisiert, die direkt aus Cambium-Initialen oder — genauer — aus Phloem-Mutterzellen ohne neue Längsteilung hervorgegangen sind. Die Abtrennung der Geleitzelle führt zu einer anderen Wandbildung als die Abtrennung einer prospektiven Parenchymzelle in der Cambium-

Initiale. So ist die Spindelform der Geleitzelle bei unserem Objekt ein wichtiges Kriterium gewesen. In anderen Fällen genügt die Betrachtung der Zellumrisse und Anordnung jedoch nicht zur Kennzeichnung (ESAU und CHEADLE 1955, Tafel II B).

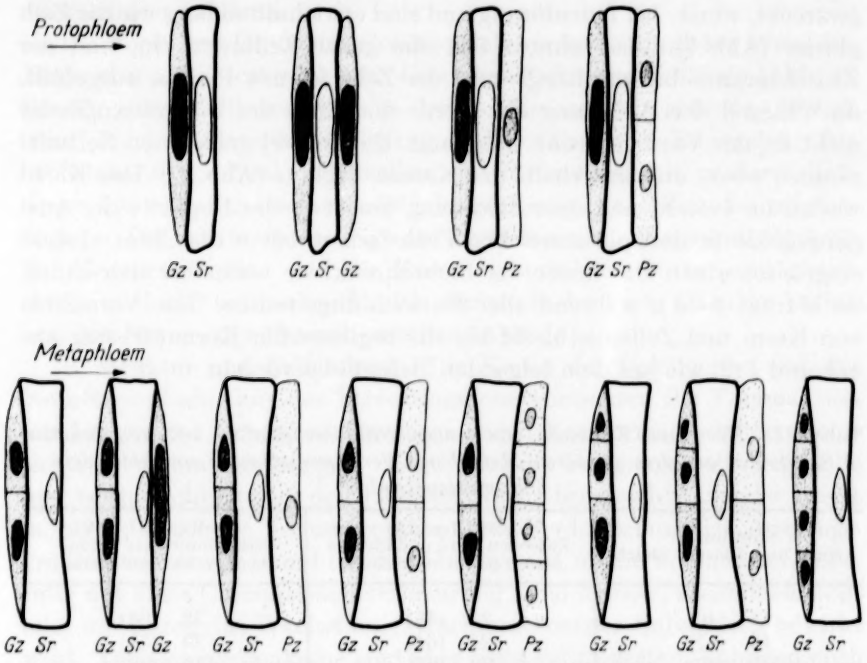
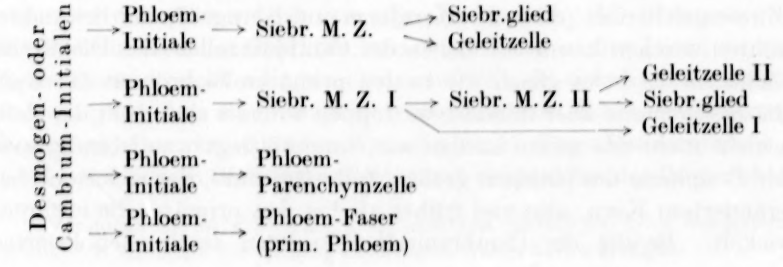


Abb. 7. Histologie des Phloems von *Vicia faba* (nur Leptomanteil). Schema, angefertigt nach den in KE-Präparaten gefundenen Zellgruppen. (Weitere Kombinationen sind — zunächst hypothetisch — möglich.) Die Zellängen sind normalisiert; die primären Elemente haben eine oft sehr viel größere Länge und die Länge der sekundären Elemente variiert stark. *Gz* = Geleitzelle, *Sr* = Siebröhre bzw. Siebröhrenglied, *Pz* = Sieb-Parenchymzelle. Die obere Reihe repräsentiert den Primärtyp, die untere den Sekundärtyp, die ersteren davon (primäres Metaphloem) vermitteln zwischen beiden. Bei typisch sekundären Siebröhren keine zweite Geleitzelle. Diese zweite *Gz* kann in ihrer Ausbildung auch weniger plasmareich sein als oben dargestellt, aber trotzdem von spindelförmiger Gestalt („Nebengeleitzelle")

Im untenstehenden Schema sei die Entstehung und Verwandtschaft der einzelnen Zellsorten des Phloems von *Vicia faba* dargestellt (Siebr. M.Z. = Siebröhrenmutterzelle)



III. Karyologie der Siebröhren und Geleitzellen

1. Morphologie. Primär- und Sekundärsiebröhren unterscheiden sich in den frühen kernhaltigen Stadien noch durch die Form und relative Größe der Zellkerne. Die Kerne der primären Siebröhren sind langgestreckt, wurst- bis fadenförmig und sind etwa halb so lang wie die Zellglieder (Abb. 7). Sie nehmen fast die ganze Zellbreite ein, und der Zwischenraum bis zur Längswand der Zelle ist mit Plasma ausgefüllt, da während der Auflösung des Kerns die Mitte des Siebröhrengliedes nicht an der Vacuolisierung teilnimmt, die in zwei getrennten Zellsafträumen ober- und unterhalb des Kernes beginnt (Abb. 2). Das Kernwachstum besteht aus einer Streckung um etwa das Doppelte der Ausgangsgröße in den plasmareichen Frühstadien, bevor die Chromatolyse eingeleitet wird. Die Breite der Siebröhrenkerne verändert sich kaum, sie beträgt 4—6 μ während aller Entwicklungsstadien. Das Verhältnis von Kern- und Zellänge bleibt bis zur beginnenden Kernauflösung annähernd 1:2, wie aus dem folgenden Beispiel hervorgeht:

Tabelle 1. *Kern und Zellängen von jungen Siebröhrengliedern mit ungefächerten Geleitzellen aus dem primären Metaphloem der Sproßachse, 5 mm unter dem Vegetationskegel.*

Stadium I Kern und Plasma gleich	Stadium II Zwischen Kern und Plasma schwacher Unterschied	Stadium III—IV Siebröhren mit beginnender Kernauflösung
18 (40)	25 (45)	32 (64)
19 (47)	24 (64)	39 (58)
18 (40)	29 (63)	40 (86)
24 (42)	24 (46)	36 (66)
	32 (71)	51 (90)
	38 (69)	39 (65)
		39 (68)
		40 (70)

Zahlen in μ; Länge der Zellen in Klammern.

Die Siebröhren des sekundären Phloems dagegen, die kein Streckungswachstum zeigen, besitzen von Anfang an einen relativ kleinen und ovalen oder spindelförmigen Kern (Abb. 4—7). Übergangsformen zwischen beiden Typen finden sich in den primären Siebröhren (Metaphloem) mit Zweiergeleitzellen (Abb. 2). Kernform und Kerngröße der Sekundärsiebröhren weichen kaum von denen der Cambiumzellen ab. Die Breite der Zellkerne ist etwa gleich wie in den primären Siebröhren (4—6 μ). Da die Zellelemente aber mindestens doppelt so breit sind, füllt der Zellkern nicht mehr das ganze Lumen aus, sondern liegt wandständig und an der Peripherie des einzigen großen Zellsaftraumes, der sich noch bei unverändertem Kern, also viel früher als bei den primären Siebröhren, entwickelt. Bereits die Cambiumzellen besitzen stark vacuolisiertes

Plasma (siehe auch BAILEY 1930). Die Form der Zellkerne läßt sich mit der frühen Vacuolisation der Cambiumabkömmlinge und die veränderte Kern-Plasma- oder Kern-Zellgrößen-Relation mit dem anderen Ausgangszustand und dem fehlenden Streckungswachstum der sekundären Siebröhrenglieder erklären.

Die Form und Größe der Geleitzellenkerne ist in ähnlicher Weise bedingt, aber außerdem noch vom Grad der Fächerung abhängig (Abb. 7). Die längsten Zellkerne wurden beim Primanentyp gefunden (80 μ); beim primären Metaphloem betrug die Kernlänge bei Einergeleitzellen höchstens 40 μ. Zweiergeleitzellen von Siebröhren mit größerer Zelllänge (150 μ) haben höchstens 30 μ lange Kerne. Ihre Form ist tropfenförmig. Das breite Ende zeigt zur gemeinsamen Querwand (Abb. 5). Bei Vierergeleitzellen sind die Kerne entsprechend kürzer und gleichmäßig oval und unterscheiden sich weniger in der Form als in der Dichte von den Kernen der Parenchymzellen (Abb. 15).

2. Struktur und Endomitose. Die Kerne der Geleitzellen und der Siebröhrenglieder aus der Streckungszone vermehren ihr Volumen um mindestens das Doppelte. Die eigenartigen Kernformen erlauben keine sicheren Volumenmessungen. Legt man die Ausgangsgröße zugrunde und berücksichtigt man den Längenzuwachs bei gleichbleibender Breite (s. oben), so ist die Volumenzunahme als Verdoppelung der Ausgangsgröße zu schätzen. Damit taucht die Frage auf, ob die Volumenvergrößerung mit einer Chromosomenvermehrung (Endomitose) zusammenhängt oder nur durch das Wachstum extrachromosomaler Substanzen bewirkt wird. Die Geleitzellenkerne sind aber trotz vergrößertem Volumen noch dichter mit Chromatin gefüllt als im Ausgangszustand, so daß bei ihnen mindestens *eine* Endomitose abgelaufen sein müßte. Bei den chromatinarmen und schließlich chromatolysierten Siebröhrenkernen erscheint dies zunächst unwahrscheinlich.

Der Nachweis der endomitotischen Polyploidie ist mit Hilfe von Volumenmessungen und Strukturanalyse auch dann zu führen, wenn keine Kernteilungen ausgelöst werden können, die die Chromosomenzahl direkt ablesen lassen[1] (TSCHERMAK-WOESS und HASITSCHKA 1954, TSCHERMAK-WOESS 1956). Die Endomitose äußert sich durch das Auftreten ähnlicher Stadien wie sie zu Beginn einer normalen Mitose durchlaufen werden (Dekondensation oder Zerstäubung der Chromozentren). Bei euchromatischen Objekten, wie *Vicia faba*, ist die Zerstäubung des Heterochromatins allerdings nicht so auffällig, da sich die Chromozentren nur wenig von dem euchromatischen Grundgerüst abheben (TSCHERMAK-WOESS und DOLEŽAL 1956 für Wurzelspitzen). Trotzdem konnten in den Kernen der jungen Siebröhrenglieder und Geleitzellen des Primärphloems

[1] Versuche, die in Entwicklung befindlichen Siebröhren oder wenigstens die Geleitzellen künstlich zur Teilung zu bringen, waren bisher erfolglos.

endomitotische Dekondensationsstadien mit gleichmäßig feinkörniger Struktur gefunden werden (Abb. 2, 8, 9, 12). Die Verdoppelung des Kernvolumens wird demnach von einer Endomitose begleitet, so daß die Kerne der sich differenzierenden primären Einergeleitzellen und Siebröhren als tetraploid angesehen werden müssen. Die Endomitose erfolgt

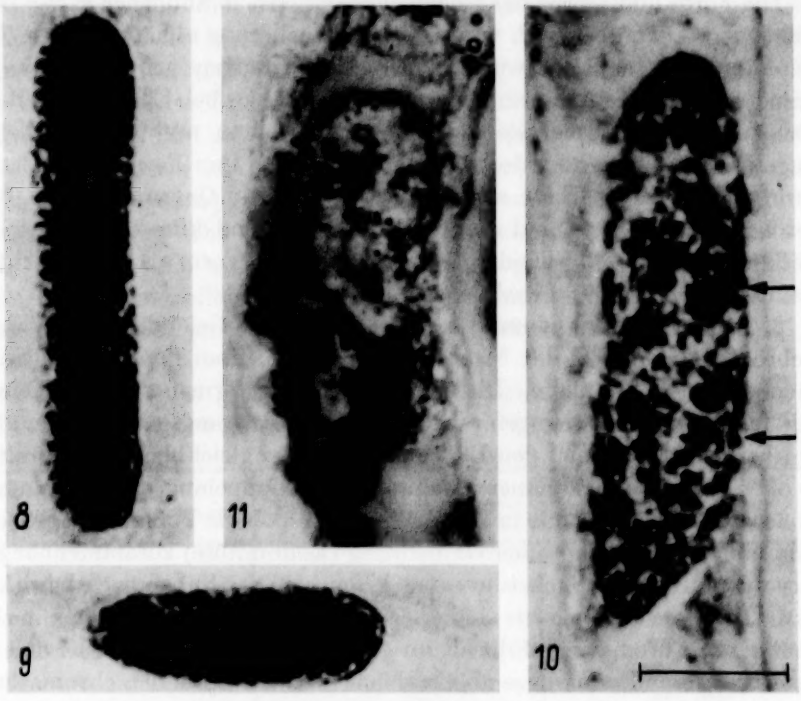


Abb. 8—12. Karyologie und Differenzierung nach Flemming-fixierten Karminpräparaten

Abb. 8. Zellkern einer 2fächrigen Geleitzelle. Endomitotische Auflockerung der Chomozentren und Hyperchromasie

Abb. 9. Zellkern einer ebenfalls 2fach unterteilten Parenchymzelle aus derselben Zellgruppe (Abb. 2), „normale" Kernstruktur, grobstrukturiert mit kompakten Chromozentren

Abb. 10. Siebröhrenkern *(Vicia faba!)* bei der Chromatolyse. Doppelchromozentren heben sich deutlich von dem schwächer tingierten Euchromatin ab. (Einige davon mit Pfeilen markiert; das obere davon ein Trabanten-Chromozentrum)

Abb. 11. Siebröhrenzellkern im Endstadium der Chromatolyse mit chromonematischen Spiralwindungen, keine Pyknosen!

zu Anfang der Differenzierung, bald nach der inäqualen Zellteilung, wenn noch kein deutlicher Färbungsunterschied vorhanden ist und die Zellstreckung beginnt.

Die endomitotische Polyploidisierung der Siebröhrenglieder wurde eingangs wegen der stattfindenden Chromatolyse als fraglich hingestellt. Aber gerade während der Kernauflösung wird die Tetraploidie des Zellkernes durch die dabei auftretenden Strukturen bestätigt. Die Chromatolyse beginnt in den euchromatischen Chromosomenteilen (Euchromo-

nema). Sie werden schwächer färbbar und erscheinen grobmaschig (Abb. 1, 2). Dadurch treten die Chromozentren stärker hervor, wie das bei Kerntypen mit vorwiegend heterochromatischen Chromosomen der Fall ist (*Oenothera*, *Impatiens*, *Cucurbita* usw.). Normalerweise sind die Chromozentren von *Vicia faba* abgerundet und nur schwer vom Euchromonema zu unterscheiden. Bei der Chromatolyse werden sie deutlicher und außerdem entspiralisiert. In diesem Stadium lassen sie sich

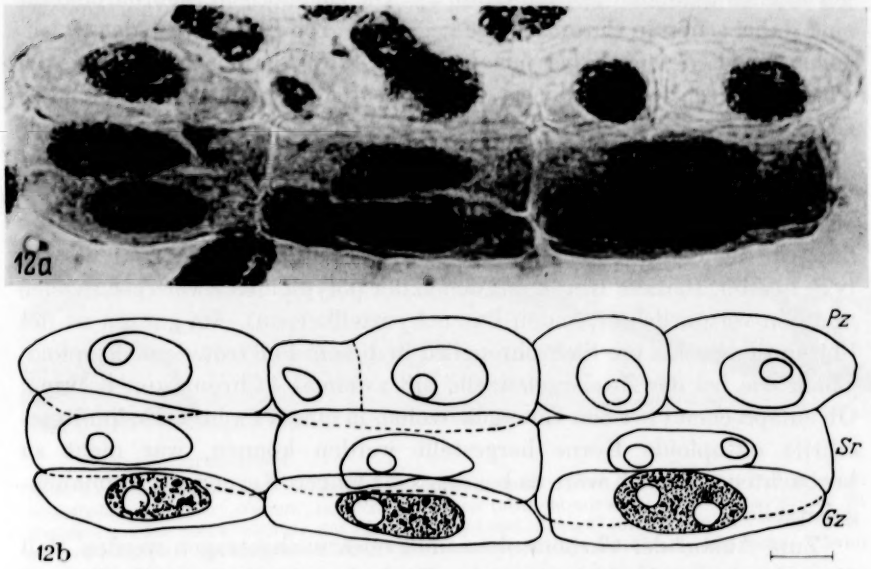


Abb. 12a u. b. Dreizellige Siebröhre mit *Gz* und *Pz* in der Entwicklung vom kerngleichen Zustand (links) zur endomitotischen (und hyperchromatischen) Kernstruktur in der Geleitzelle, bei kaum feststellbarem Unterschied in der Plasmadichte! Eine der Parenchymzellen mit degeneriertem Zellkern

ganz deutlich als Doppelchromozentren erkennen (s. Erklärung zu Abb. 10). Daraus kann auf den tetraploiden Chromosomensatz der Siebröhrenkerne vor oder bei der Chromatolyse geschlossen werden. Zum Schluß der Chromatolyse lassen sich entspiralisierte (hetero- oder euchromatische ?) Chromosomenteile beobachten, die so angeordnet sind, wie sie in Prophasen tetraploider Kerne der Sproßachse beobachtet wurden (Resch 1952). Woll (1954) vermutete Tetraploidie der Siebröhrenkerne von *Acer pseudoplatanus*.

Die Endomitose der Geleitzellenkerne erfolgt nur beim Einerzelltyp in den frühen Stadien der Siebröhrenentwicklung (Abb. 12). Sonst müßte die Querteilung (Fächerung) der Geleitzelle, die zum Zweierzelltyp führt, eine tetraploide Mitose zeigen. Die „Querteilungsmitose" ist aber immer diploid (Abb. 1). Die Endomitose zu Beginn der Geleitzellenentwicklung unterbleibt offenbar, wenn nach der inäqualen Zellteilung eine äquale

Teilung der prospektiven Geleitzelle vorbereitet wird. So treffen wir wieder auf das eigentümliche „Vicariieren" von Endomitose und Mitose (GEITLER 1953, p. 73). Der Gesamtchromosomensatz einer Geleitzelle ist polyploid, ob nun eine einfache oder eine gefächerte Geleitzelle ausgebildet wird. Die Zellkerne einer Zweiergeleitzelle dürften aber auch *nach* der äqualen Teilung noch endomitotisch polyploid werden. Die entsprechenden endomitotischen Stadien bzw. Strukturen sind bei Zweiergeleitzellen gefunden worden (Abb. 2). Die zugehörigen Siebröhrenkerne sind dabei schon in Chromatolyse begriffen. Die Endomitose der Geleitzellen findet demnach bei ungefächerten kurz vor der Ausbildung der Plasmadifferenzierung und bei gefächerten (Zweiergeleitzellen) nach dieser statt.

Bei der Entwicklung der Sekundärsiebröhren mit mehrfach gefächerten Geleitzellen konnten keine endomitotischen Strukturen beobachtet werden. Die äqualen Teilungen sind noch diploid (Abb. 4). Es ist fraglich, ob die Kerne einer Vierergeleitzelle überhaupt polyploid werden (vgl. in Abb. 15 diese Kerne mit denen der polyploiden Zweiergeleitzellen und den vermutlich diploiden Parenchymzellkernen). Im ganzen ist der Chromosomensatz pro Siebröhrenglied in diesem Fall trotzdem oktoploid, genau wie bei der Zweiergeleitzelle mit zweimal 4 Chromosomensätzen. Ob entsprechend bei den Einergeleitzellen in einem zweiten Endomitoseschritt oktoploide Kerne hergestellt werden können, war nicht zu beobachten. Möglich wäre es bei den sehr langen Kernen der Primanengeleitzellen.

Zum Ablauf der Chromatolyse muß noch nachgetragen werden, daß diese durch eine Verkleinerung der Nucleolen eingeleitet wird. Sie sind zuletzt nur schwer aufzufinden, da sie sich in der Größe (ca 1—2 μ Durchmesser) nicht von den Chromozentren unterscheiden. Mit Hilfe von Gegenfärbungen konnten sie aber auch dann nachgewiesen werden. Noch vor dem Verfall der Kernstrukturen werden sie gänzlich aufgelöst. Es sind aber Fälle bekannt, bei denen die Nucleolen aus dem Kern austreten [*Rubus*, *Gossypium* und *Eucalyptus* (ESAU 1947)].

IV. Inhaltskörper der Siebröhren

In jungen Siebröhren vieler Pflanzen bilden sich „Schleimtropfen", die im allgemeinen bei der Ausdifferenzierung wieder verschwinden. Nur bei den Leguminosen wird der in Einzahl auftretende „Schleimkörper" nicht aufgelöst, sondern bleibt ein charakteristischer Bestandteil der fertigen Siebröhrenglieder (STRASBURGER 1891, MRAZEK 1910).

Dieser „Schleimtropfen" oder „Schleimkörper" entwickelt sich bei *Vicia faba* als kleines ovales Gebilde im Plasma an irgendeiner Stelle der Zelle, manchmal in Kernnähe. Der Schleimkörper wird spindelförmig, zuletzt annähernd oder ganz kugelig. Er erscheint in den älteren Sieb-

röhren durch Formveränderung oder Korrosion gebuchtet oder gelappt. Er zeigt auch Ein- oder Durchschnürungen, so daß biskuitförmige oder geteilte Schleimkörper zustande kommen. Mit Jod oder Millonschem Reagens gibt der Schleimkörper Eiweißreaktion. Man kann ihn besser als Protein- oder Eiweißkörper bezeichnen, wie das schon MRAZEK vorgeschlagen hat. Bedeutsam ist, daß er in zeitlicher Abhängigkeit von der Chromatolyse entsteht: Er wird sichtbar, wenn der Kern mit dem Chromatinabbau beginnt und erreicht seine volle Ausbildung mit der Auflösung des Kernes.

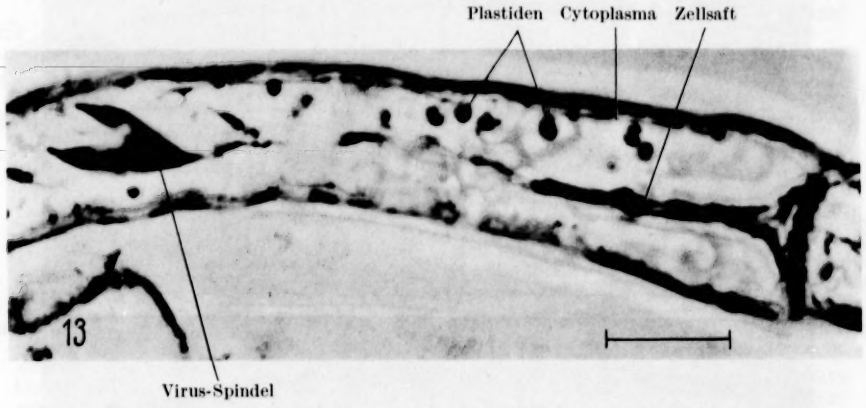


Abb. 13. Konstitution des Siebröhrenprotoplasma im fixierten Zustand. Der Cytoplasmawandbelag als feiner „Faden" mit Verdickungen (Mitochondrien?). Die Virus-Spindel ist dreizackig (eine Spitze nicht in der Einstellebene) und „hängt" im koagulierten Siebröhrensaft. Rechts die Siebplatte. Flemming-Fixierung, HCl-Behandlung, ungefärbt, Phako

Die von STRASBURGER (1891) bei *Wistaria* und *Robinia* beobachteten Fäden, mit denen der „Schleimkörper" an den Siebplatten aufgehängt sein soll, sind jetzt auch bei *Vicia faba* gefunden worden (durch Gegenfärbung von Karminpräparaten). Nach unseren Präparaten ist dieser Faden aber der koagulierte und durch den Abfluß der leichtflüssigen Bestandteile kontrahierte Siebröhrensaft (Abb. 13). Der Eiweißkörper befindet sich demnach zuletzt im Zellsaft und ist nicht mehr von Plasma umschlossen.

Die meisten Pflanzen aus dem Untersuchungsjahr 1956 zeigten nach starkem Läusebefall Anzeichen einer Mosaikkrankheit. In den sekundären Siebröhren dieser Pflanzen wurden außer den Eiweißkörpern noch Eiweißspindeln (ebenfalls Millon-positiv) gefunden, wie sie in anderen Fällen als Begleiterscheinung von Virusmosaikerkrankungen vorkommen (WEBER 1954, weitere Literatur KÜSTER 1956, p. 122, 490). Die Symptome der Viruskrankheit (gelbfleckige Blätter und Kümmerwuchs) zeigten sich bei *Vicia faba* erst einige Zeit nach dem Auftreten dieser Viruskörper. Die von SCHAFFNIT und WEBER (1927) bei *Vicia faba*

beschriebenen Inhaltskörper der Siebröhren entsprechen teils den oben genannten Eiweißkörpern, teils den Virusspindeln. Letzteren ähnliche Gebilde fand LEE (1955) im Bastteil von tumorkranken Steinkleepflanzen. Im Phloem älterer *Vicia*-Pflanzen stellten sich entsprechende Degenerationserscheinungen (Zellwucherungen) ein, wie sie von anderen Objekten bekannt sind (ESAU 1956, 1957).

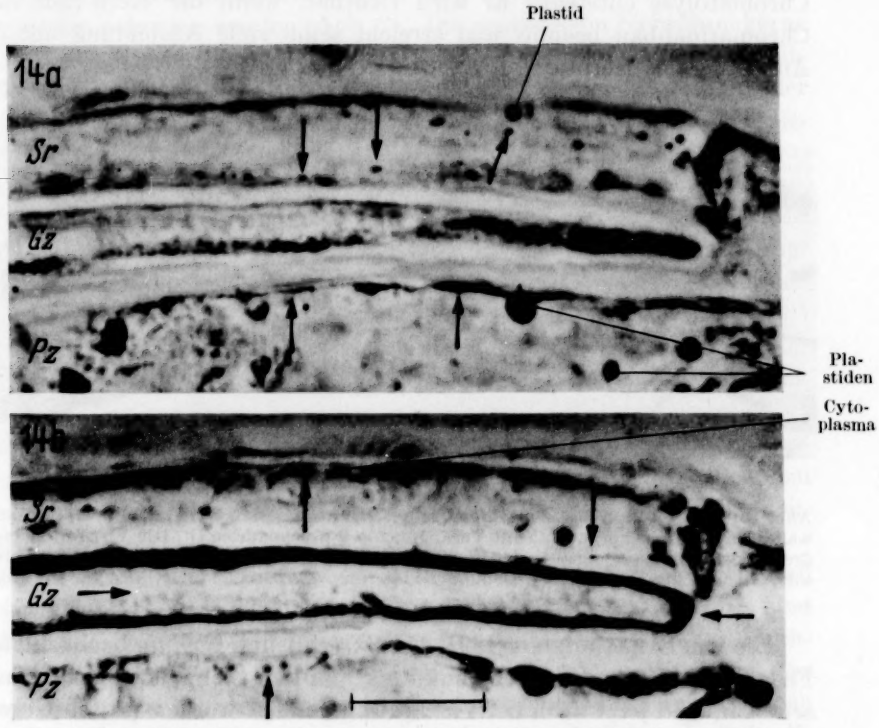


Abb. 14a u. b. Inäqualität zwischen Siebröhre und Geleitzelle bezüglich der Menge von Plasmapartikeln (Pfeile) bei Einstellung auf: die Siebröhre (a) und die Geleitzelle (b). Flemming-Fixierung, HCl-Behandlung, ungefärbt, Phako. Vgl. Parenchymzelle (*Pz*)

Die Eiweißspindeln oder Nadeln der infizierten Siebröhren ergaben die gleiche Eiweißreaktion und Färbung wie die „normalen" Proteinkörper. Sie lassen sich aber durch ihre Gestalt und Größe leicht von diesen unterscheiden (Abb. 4, 6, 15). Gelegentlich zeigen sie faserigen Bau oder sind an den Enden gespalten. Die nach WEBER für Virus-Eiweißspindeln typischen Vorstufen (X-bodies) wurden nicht beobachtet. Der Zusammenhang der Eiweißspindeln in den Siebröhren von *Vicia faba* mit der Virusinfektion ist aber wohl nicht von der Hand zu weisen. Die Übertragung der Virusinfektion erfolgt durch Blattläuse und die Ausbreitung der Krankheitskeime in den Siebröhren (CRAFTS 1939, HUBER 1942, 1956).

Von den übrigen im Plasma gebildeten Zellbestandteilen sei an dieser Stelle vermerkt, daß nur die Plastiden der Siebröhren Stärke bilden. Sie läßt sich noch vor dem Kernverlust nachweisen und nimmt dann auffallend zu. Die Geleitzellen enthalten dagegen eine besonders große Menge von noch nicht näher identifizierten Plasmapartikeln (Mitochondrien ?), die in der Siebröhre nur spärlich anzutreffen sind (Abb. 14). Beides, Stärkekörner und Plasmapartikel, unterstreichen die Inäqualität der beiden Tochterzellen. Es muß noch geprüft werden, ob die ungleiche Menge der Plasmapartikel schon bei der inäqualen Zellteilung zustande

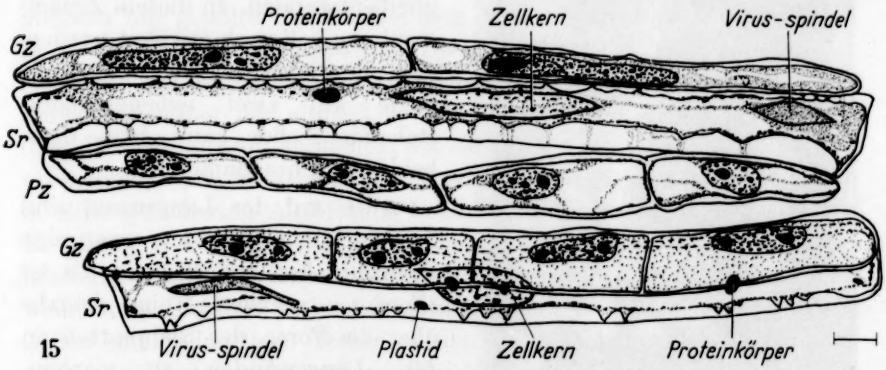


Abb. 15. Zellgruppe des sekundären Phloems aus einem Macerationspräparat (Karmin-Lichtgrün). Die obere Siebröhre (mit Zweiergeleitzelle) ist zuerst, dann die Parenchymzelle (4fächrig) und zuletzt die Siebröhre mit den Vierergeleitzellen vom Cambium abgegeben worden. Das ergibt sich aus dem Stadium der Chromatolyse. Die 2fächrige *Gz* tetraploid, die 4fächrige *Gz* vermutlich nur diploid

kommt und ein morphologisches Indiz für die entwicklungsphysiologische Inäqualität ist oder ob auch dieses wie beim Zellkern und Plasma erst nachträglich durch ungleiche Vermehrungsrate hergestellt wird (Bünning 1958).

V. Die Zellwand der Siebröhren

Die Differenzierung der Zellmembran der Siebröhren wurde mit dem Phasenkontrast- und Polarisationsmikroskop geprüft. Bei der Beobachtung zwischen gekreuzten Polarisationsfiltern zeigen schon die frühen Stadien ein deutliches, jedoch noch nicht kräftiges Aufleuchten der Längswand des Siebröhrengliedes. So lassen sich in unübersichtlichen Präparaten und in den Fällen, wo die Zellkombination auf Grund der übrigen cytologischen Merkmale nicht näher bezeichnet werden kann, die Siebröhrenglieder eindeutig als solche identifizieren. Auch das Auffinden der älteren, inhaltsarmen, kaum gefärbten Siebröhren wird oft erst durch die Anwendung des Polarisationsverfahrens möglich gemacht (Resch 1954).

Die Enden der Siebröhrenglieder zeigen bei den jungen Stadien keine oder nur schwache Doppelbrechung; sie sind noch embryonaler als der

Mittelteil und das Längenwachstum erfolgt bei schon verstärktem Mittelteil hauptsächlich an den Zellenden. Diese sind unter Umständen befähigt, über die Siebplatte hinauszuwachsen und eine Zellspitze zu bilden, in einer Weise, die an das Spitzenwachstum der Faserzellen erinnert (vgl. MÜHLETHALER 1950, RESCH 1954). Möglicherweise ist die doppelt laterale Siebröhrenverbindung, die auf Abb. 17 zu sehen ist, durch den Anschluß *einer* über die Siebplatte hinausgewachsenen Siebröhrenspitze an das nächstfolgende Siebröhrenglied entstanden. In diesem Zusammenhang soll noch erwähnt werden, daß ein Siebröhrenglied mit einem Ende auf zwei nebeneinanderstehende stoßen kann, bzw. diese beiden in jenes einmünden.

Abb. 16. Siebröhrenwand. Aufsicht auf laterale Siebplatte (große, eckige Poren) und 2 Siebfelder mit kleineren runden Tüpfeln oder Poren. Phako

Auch auf der Längswand sind Siebplatten ausgebildet, wenn eine Siebröhre benachbart liegt. Es ist allerdings schwierig, eine Angabe über die Poren der Siebplatten an den Längswänden zu machen, manchmal erscheinen sie perforiert, manchmal nicht (Siebtüpfel). Auf Grund der Differenzierungsweise der Siebplatten der Querwände könnte bei einer Siebplatte mit eckigen Poren eine Perforation vorhanden sein (mittlere Siebplatte in Abb. 16). Die im ganzen und auch in den „Poren" kleineren Siebplatten darüber und darunter sind vielleicht nur vergröberte Plasmodesmenfelder. So sind möglicherweise perforierte und unperforierte, echte und unechte Siebplatten auf ein und derselben Siebröhrenlängswand angeordnet (dazu siehe die elektronenoptischen Befunde, HUBER und KOLBE 1948, VOLZ 1952).

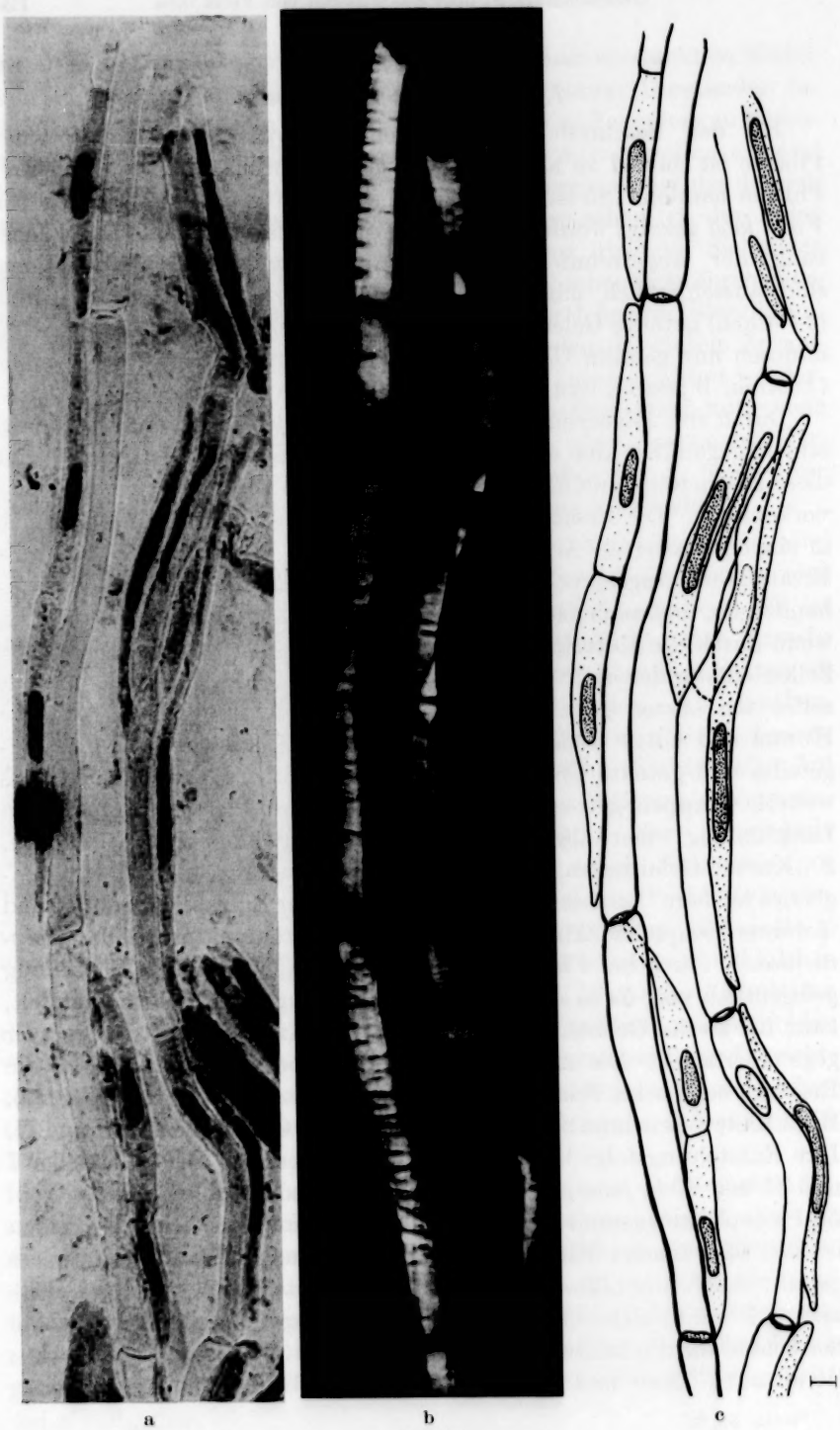
Die Abb. 17 zeigt noch einmal die verschiedenen Differenzierungserscheinungen an zwei längeren Siebröhrenstücken. Hinzuweisen ist dabei noch auf den Differenzierungsgradienten innerhalb einer Siebröhre, der sich besonders am Grad der Kernauflösung ablesen läßt. Bei sorgfältiger Maceration lassen sich Siebröhren von mehr als 20 Einzelelementen isolieren, ohne daß diese zerfallen; in einer solchen Siebröhre ist der gesamte Differenzierungsvorgang vom einen zum anderen Ende schrittweise verfolgbar.

D. Besprechung

I. Histologische Ergebnisse

Bei der Beschreibung des Geleitzellentypes einer angiospermen Pflanze ist darauf zu achten, ob es sich um primäres oder sekundäres Phloem handelt. So ist in der vorliegenden Arbeit für das Phloem von *Vicia faba* gezeigt worden, daß sich im Laufe der Ontogenie eine Fächerung der abgetrennten Geleitzellen durchsetzt. Im Protophloem sind ausschließlich ungeteilte, im sekundären Phloem ausschließlich (2—4fach) geteilte Geleitzellen vorhanden. Bisher wurden für die Leguminosen nur geteilte Geleitzellen (sog. Geleitzellenstränge) beschrieben (*Robinia*, *Wistaria*, STRASBURGER 1891, HUBER 1939).

Durch die Fächerung der Geleitzellen ist kein wesentlicher Unterschied gegenüber der einfachen Geleitzelle gegeben. Vergleichbar ist diese Erscheinung mit ähnlichen, wie sie bei den Ersatzfasern des Xylems vorkommen. Die Ersatzfasern sind sowohl in der „normalen" als auch in einer gefächerten Ausbildung bekannt. Sie werden immer dann als Ersatzfasern angesprochen, wenn im gesamten die Fasergestalt vorhanden ist, und auch dann nicht zu den Holzparenchymzellen gerechnet, wenn durch die Unterteilung innerhalb der Ersatzfasern jenen ähnliche Zellen entstanden sind. Daher werden bei der Betrachtung der Geleitzellen am besten ganz andere Gesichtspunkte vorangestellt, wie das HUBER und GRAF (1955) getan haben. Diese Autoren rechnen die ungeteilte und geteilte Geleitzelle in eine Kategorie. Davon werden zwei weitere Gruppen getrennt: 1. Geleitzellenfelder, die durch Quer- *und* Längsteilung einer abgetrennten prospektiven Geleitzelle entstehen, 2. „Kurze" Geleitzellen, die nicht über die ganze Länge eines Siebröhrengliedes reichen. Letztere wieder entstehen in der Einzahl oder auf Grund mehrerer inäqualer Zellteilungen aus der Siebröhrenmutterzelle *(Polycarpicae)*. Auch bei *Vicia faba* kommt eine zweite inäquale Zellteilung gelegentlich vor; da es sich hier immer um „lange" Geleitzellen handelt, kann die zweite Geleitzelle der erst abgetrennten nur mehr oder weniger gegenüberliegen. Die Abtrennung einer zweiten Geleitzelle scheint die Regel zu sein beim Protophloem der Gerstenwurzel (HAGEMANN 1957). HAGEMANN bezeichnet die beiden entstehenden Geleitzellen mit I und II. Ihre Entstehungsfolge läßt sich aber nicht erkennen. Die Geleitzellen I und II bei *Vicia faba* gleichen einander entweder vollkommen, sowohl im Protoplasmazustand als auch in der Fächerung, oder eine der beiden ist von schwächerer Fächerung, oder eine ist ungeteilt und die andere geteilt. Auch hier läßt sich nicht entscheiden, welche der beiden Geleitzellen „I" und welche „II" ist. Man ist allerdings geneigt, die typischere der beiden für die zuletzt abgetrennte zu halten. In diesem Sinne diskutieren auch ESAU und CHEADLE (1955) ihre Beobachtungen über das



a b c

Abb. 17

sekundäre Phloem einiger Holzpflanzen. Diese Autoren bezeichnen nur die bei den letzten Teilungen im Phloem gebildeten Zellen als Geleitzellen. Eine große Affinität zu den Siebröhren besitzen dann noch solche Siebparenchymzellen, die „aus derselben Mutterzelle wie das Siebröhrenglied stammen" (gleichzusetzen unserer Geleitzelle I mit geringerer Plasmadichte; so wird von diesen Zellen gesagt: „sie können teilweise nur schwer von den Geleitzellen unterschieden werden"). Zuletzt beschreiben ESAU und CHEADLE „weniger assoziierte" Parenchymzellen, die von einer eigenen Mutterzelle abstammen, also echte Siebparenchymzellen darstellen. Solche Unterscheidungen lassen sich in Tangentialschnitten durch das sekundäre Phloem gut dann vornehmen, wenn das Zellgitter des Cambiums auch im ausdifferenzierten Zustand nachweisbar bleibt. Doch haben auch ESAU und CHEADLE bei der Diagnostizierung weniger die Zellform als den Zellinhalt (vor allem Plasmadichte) beachtet. Wie wir nun vorläufig die Geleitzellen I oder Nebengeleitzellen auch nennen wollen, sie sind, wie ESAU und CHEADLE betonen, Übergangsformen (auch in ihrer physiologischen Funktion) zwischen typischen Geleitzellen und typischen Parenchymzellen. Ist eine Zelle durch eine bogenförmige Wand aus dem Siebröhrenglied auf die ganze oder einen Teil der Länge herausgeschnitten, würden wir sie jedenfalls definitionsgemäß als Geleitzelle ansprechen, alle anderen die Siebröhre begleitenden Zellen mit geraden Wänden und stumpfen Zellenden dagegen immer als Parenchymzellen. Die von uns vorgenommene protoplasmatische (karyologische) Anatomie deckte sich bei der Identifizierung immer mit der Zellwandanatomie.

Wir kennen im Phloem noch eine andere Art von Übergangsformen zwischen Zelltypen, bereits allgemein „Übergangszellen" genannt, die in den Nervenendigungen der Blätter die Geleitzellen und Siebröhren ablösen. Morphologisch vergleichbar sind diese Übergangszellen mit den von BRAUN (1957) in den Dioscoreaceen-Knoten gefundenen „Phloembeckenzellen", die zwischen den Siebröhren der Internodien und der Seitenorgane als „Staubecken" vermitteln. Statt aus kernlosen Siebröhren und plasmareichen Geleitzellen besteht im Phloembecken der Assimilationsleitungsstrang ausschließlich aus kernhaltigen, nicht übermäßig plasmareichen Zellen. Es sei ein Vergleich erlaubt: Im Xylem

Abb. 17. a—c. Zwei Siebröhren mit anhaftenden Geleitzellen, aus einem Karminpräparat, vermutlich zu einem einzigen Gefäßbündel gehörend. a) Hellfeld, b) zwischen gekreuzten Pol-Filtern, c) Nachzeichnung. Die ältere plasmaarme Siebröhre ohne Zellkern mit Zweiergeleitzellen in verschiedener Anordnung. In der anderen Siebröhre von Zelle zu Zelle fortschreitende Kernauflösung und noch reichlich Plasma sowie ungeteilte Geleitzellen mit sehr stark gefärbten Zellkernen. Auffällig die Überlappung der beiden mittleren Zellen der Siebröhre, die zu 2fach lateralem Anschluß führt. Die Doppelbrechungserscheinungen lassen die dicht und gleichmäßig liegenden Tüpfel zwischen Geleitzellen und Siebröhren bei seitlicher Ansicht als „gezähnten" Rand der Siebröhre erscheinen. Aber auch auf der übrigen Zellwand der Siebröhre ± schrägstehende, unverdickte Stellen. — Die Maßstrecke entspricht wie in allen vorherigen Abbildungen der Objektlänge von 10 μ

gibt es ebenfalls viele „Übergangszellen", z.B. Fasertracheiden, also Elemente, die zwei Funktionen, Leitung und Festigung, ausüben können. Sie sind folglich weniger spezialisiert, aber vielseitiger. Dieser Vergleich hinkt etwas, wenn man ihn nur physiologisch betrachtet. Aber bei toten Zellelementen wie Fasern und Tracheiden ist reine Zellwandanatomie die einzige und richtige Kennzeichnung der Funktion. Daraus ist die reichhaltige Typisierung der Holzelemente, die allgemein durchgeführt wird, verständlich. Gerade diese Diskrepanz zwischen Holz- und Siebteilhistologie ermutigt uns, eine Erweiterung der Phloemhistologie zur Diskussion zu stellen. (Es sei aber vermerkt, daß sie vorerst nur auf den Beobachtungen bei *Vicia faba* fußt und vor allem keine physiologischen Übergänge berücksichtigt.)

Histologie des Phloems

Siebröhren	bzw. Siebröhrenglieder
Übergangszellen	(in Blattnerven oder als „Phloembeckenzellen")
Geleitzellen	ungeteilt (Primärtyp)
	geteilt, gefächert (Sekundärtyp)
Ersatzgeleitzellen	(Geleitzelle I, Nebengeleitzelle)
	mit parenchymähnlichem Protoplasmacharakter
	ungeteilt (Primärtyp)
	geteilt (selten beobachtet)
Phloemparenchymzellen	ungeteilt (primär), geteilt (sekundär)
Phloemfaserzellen	bei *Vicia faba* nur primär und ungeteilt

II. Karyologische Ergebnisse

Eine der spezifischen Differenzierungsvorgänge in den Siebröhrengliedern ist die Auflösung des Zellkernes, die wir in ihrer Bedeutung noch nicht ganz erfassen können, die aber zweifellos eine der Voraussetzungen zur Umschaltung normaler Zellvorgänge in die spezifischen dieser Leitungsbahnen darstellt. So erscheint es direkt unnötig, ja sogar unzweckmäßig, daß vor der Chromatolyse eine endomitotische Polyploidisierung zustande kommt. So weit unsere Beobachtungen bis jetzt reichen, erfolgt die Polyploidisierung nur in den primären Siebröhren. Das würde bedeuten, daß sie für die Differenzierung der Siebröhren entbehrlich ist. Wie in vielen anderen Fällen ist die Endomitose auch hier vielmehr eine Begleiterscheinung des Zellwachstums, sei sie nun ursächlich oder abhängig. Über die Induktion von Endomitosen wissen wir heute, daß sie dann erfolgen kann, wenn das meristematische Teilungswachstum erlischt, also etwa zwischen Determinations- und Differenzierungszone ihr Maximum hat. Nun sind die Siebröhren und Geleitzellen, die zuerst gebildet werden, Vorposten der Gefäßbündeldifferenzierung, in einer Zone entstehend, die in den übrigen Procambiumzellen noch lebhafte Zellteilungstätigkeit, also auch DNS-Synthese, aufweist (zum Teil auch noch

im Grundgewebe). Zellen, die in einer solchen Zone liegen, aber schon zum Zellwachstum übergegangen sind, werden offenbar von dieser DNS-Synthese nicht ausgenommen, die sich dann in endomitotischer Polyploidisierung äußert.

Die endomitotische Polyploidisierung der Geleitzellen entspricht ihrem Drüsencharakter. Sie ist aber auch da nicht obligatorisch. Setzt nämlich mit fortschreitender Differenzierung der Leitbündel die Fächerung der Geleitzellen ein, kommt es erst *nach* den dabei ablaufenden Mitosen oder überhaupt nicht zu einer endomitotischen Polyploidisierung. So macht die karyologische Anatomie der Siebröhren und Geleitzellen auf zwei Phänomene der Endomitose aufmerksam: Ihr Zusammenhang mit Zellwachstumsvorgängen ist größer als mit speziellen Differenzierungsleistungen und zweitens, die Verlängerung der mitotischen Aktivität in postembryonalen Zellen hemmt oder unterdrückt die endomitotische Polyploidisierung.

Zusammenfassung

1. Die Siebröhren der Sproßachse von *Vicia faba* zeigen folgende Geleitzellenkonfiguration:

a) Immer über die ganze Länge der Siebröhrenglieder reichend, sind die Geleitzellen bei den Siebprimanen und meist auch beim Metaphloem ungeteilt und besitzen einen polyploiden Zellkern.

b) Im sekundären Phloem kommt es nach der inäqualen Zellteilung zu ein bis drei Querteilungen in der Geleitzelle (geteilte Geleitzelle oder Geleitzellenstrang mit 2 bis 4 Zellen), was zu verminderter oder fehlender Kernpolyploidie führt.

c) Durch eine zweite inäquale Zellteilung in der Siebröhrenmutterzelle entstehen beiderseits eines Siebröhrengliedes zwei gleichlange Geleitzellen (meist ungeteilte). Diese sind einander gleichwertig oder eine davon ist „Ersatzgeleitzelle".

2. Die primären und sekundären Siebröhren sind außerdem noch durch Kernform, Polyploidiegrad und relatives Kernvolumen sowie durch ihre Vacuolisierung schon in den Entwicklungsstadien eindeutig verschieden. Dasselbe gilt für die Zellgrößenrelation (Zellbreite) zwischen Siebröhre und Geleitzelle.

3. Der Nucleolus des Siebröhrenkernes wird ebenso wie das übrige Kernmaterial bei der Chromatolyse vollständig resorbiert.

4. Die Siebröhren besitzen zwar — wie schon bekannt — reichlich Plastiden, die zur Stärkebildung fähig sind, aber nur wenig von den übrigen geformten Plasmapartikeln (Mitochondrien?), während die Geleitzellen mit letzteren in auffallender Menge ausgerüstet sind.

Mein verehrter Lehrer, Herr Prof. Dr. F. Oehlkers, gestattete mir freizügiges Arbeiten an seinem Institut. Für seine Hilfe und Unterstützung möchte ich mich

auch an dieser Stelle sehr herzlich bedanken. In der letzten Phase der Untersuchungen hatte ich durch eine Beihilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft wichtige Hilfsmittel zur Ausführung meiner Arbeiten erhalten, wofür ich ebenfalls meinen Dank hier aussprechen möchte. Nicht ungenannt sollen bleiben meine Techn. Assistentin, Frl. Renate Rössler, für ihre vielfache und gute Mitarbeit, der Garteninspektor, Herr Fr. Machatzke, und seine Gärtner für die Betreuung der Kulturen, sowie Herr stud. rer. nat. M. Häcker, der sich an einigen Auswertungen beteiligt hat.

Literatur

Bailey, I. W.: The cambium and its derivative tissues. V. A reconnaissance of the vacuome in living cells. Z. Zellforsch. **10**, 651—682 (1930). — Bauer, L.: Zur Frage der Stoffbewegungen in der Pflanze, mit besonderer Berücksichtigung der Wanderung von Fluorochromen. Planta (Berl.) **42**, 367—451 (1953). — Braun, H. J.: Die Leitbündelbecken in den Nodien der Dioscoreaceae, mit besonderer Berücksichtigung eines neuartigen Typs assimilateleitender Zellen. Ber. dtsch. bot. Ges. **70**, 305—322 (1957). — Bünning, E.: Polarität und inäquale Teilung des pflanzlichen Protoplasten. In: Protoplasmatologia. Handbuch der Protoplasmaforschung, Bd. VIII. Wien: Springer 1958. 86 S. — Bünning, E., u. F. Biegert: Die Bildung der Spaltöffnungsinitialen bei Allium cepa. Z. Bot. **41**, 17—39 (1953). — Crafts, A. S.: Movement of viruses, auxins, and chemical indicators in plants. Bot. Review **5**, 471—504 (1939). — Currier, H. B., K. Esau and V. I. Cheadle: Plasmolytic studies of phloem. Amer. J. Bot. **42**, 68—81 (1955). — Esau, K.: Development and structure of the phloem tissue. I. Bot. Review **5**, 373—432 (1939). — A study of some sieve-tube inclusions. Amer. J. Bot. **34**, 224—233 (1947). — Phloem structure in the grapevine, and its seasonal changes. Hilgardia **18**, 217—296 (1948). — Development and structure of the phloem tissue II. Bot. Review **16**, 67—114 (1950). — Plant Anatomy. New York: Wiley & Sons 1953. 735 S. — An anatomist's view of virus diseases. Amer. J. Bot. **43**, 739—748 (1956). — Phloem degeneration in gramineae affected by the barley yellow-dwarf virus. Amer. J. Bot. **44**, 245—251 (1957). — Esau, K., and V. I. Cheadle: Significance of cell divisions in differentiating secondary phloem. Acta bot. neerl. **4**, 346—357 (1955). — Esau, K., H. B. Currier and V. I. Cheadle: Physiology of phloem. Ann. Rev. Plant Physiol. **8**, 349—374 (1957). — Geitler, L.: Endomitose und endomitotische Polyploidisierung. In: Protoplasmatologia. Handbuch der Protoplasmaforschung. Bd. VI C. Wien: Springer 1953. 89 S. — Hagemann, R.: Anatomische Untersuchungen an Gerstenwurzeln. Kulturpflanze **5**, 75—107 (1957). — Huber, B.: Das Siebröhrensystem unserer Bäume und seine jahreszeitlichen Veränderungen. Jb. wiss. Bot. **88**, 176—242 (1939). — Die Siebröhren der Pflanzen als Nahrungsquelle fremder Organismen und als Transportbahnen von Krankheitskeimen. Biol. generalis (Wien) **16**, 310—343 (1942). — Die Saftströme der Pflanzen. Berlin: Springer 1956. 126 S. — Huber, B., u. E. Graf: Vergleichende Untersuchungen über die Geleitzellen der Siebröhren. Ber. dtsch. bot. Ges. **68**, 303—310 (1955). — Huber, B., u. R. W. Kolbe: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Siebröhren. Svensk bot. T. **42**, 364—371 (1948). — Johansen, D. A.: Plant Microtechnique. New York: Mc. Graw-Hill Book Comp. 1940. 523 S. — Küster, E.: Die Pflanzenzelle, 3. Aufl. Jena: Gustav Fischer 1956. 986 S. — La Cour, L. F.: Improvements in plant cytological techniques. II. Bot. Review **13**, 216—240 (1947). — Lee, C. L.: Anatomical changes in sweet clover shoots infected with wound-tumor virus. Amer. J. Bot. **42**, 693—698 (1955). — Mrazek, A.: Über geformte eiweißartige Inhaltskörper bei den Leguminosen. Öst. bot. Z. **60**, 198—201, 218—231 (1910). — Mühlethaler, K.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über den Feinbau und das Wachstum der Zellmembranen in Mais- und Haferkoleoptilen. Ber. schweiz. bot. Ges. **60**,

614—628 (1950). — Resch, A.: Untersuchungen über Kerndifferenzierung in peripheren Zellschichten der Sproßachse einiger Blütenpflanzen. Chromosoma (Berl.) **5**, 296—316 (1952). — Beiträge zur Cytologie des Phloems. Entwicklungsgeschichte der Siebröhrenglieder und Geleitzellen bei Vicia faba L. Planta (Berl.) **44**, 75—98 (1954). — Endomitose (Besprechung). Z. Bot. **43**, 143—156 (1955). — Romeis, B.: Mikroskopische Technik, 15. Aufl. München: Leibniz 1948. 695 S. — Schaffnit, E., u. H. Weber: Über das Vorkommen von intrazellulären Körpern in den Geweben mosaikkranker Rüben. Forsch.-Geb. Pflanzenkr. Immunit. Pflanzenreich **4**, 23—42 (1927). — Strasburger, E.: Über den Bau und die Verrichtungen der Leitungsbahnen in den Pflanzen. Histologische Beiträge, Heft 3. Jena: Gustav Fischer 1897. 1000 S. — Tschermak-Woess, E.: Karyologische Pflanzenanatomie. Protoplasma **46**, 798—834 (1956). — Tschermak-Woess, E., u. R. Doležal: Der Formwechsel des Heterochromatins im Verlauf der Mitose von Vicia faba. Öst. bot. Z. **103**, 458—468 (1956). — Tschermak-Woess, E., u. G. Hasitschka: Über die endomitotische Polyploidisierung im Zuge der Differenzierung von Trichomen und Trichozyten bei Angiospermen. Öst. bot. Z. **101**, 79—117 (1954). — Volz, G.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Porengröße pflanzlicher Zellwände. Mikroskopie **7**, 251—266 (1952). — Wanner, H.: Phosphataseverteilung und Kohlenhydrattransport in der Pflanze. Planta (Berl.) **41**, 190—194 (1952). — Die Zusammensetzung des Siebröhrensaftes: Kohlenhydrate. Ber. schweiz. bot. Ges. **63**, 162—168 (1953). — Enzyme der Glykolyse im Phloemsaft. Ber. schweiz. bot. Ges. **63**, 201—212 (1953). — Weber, F.: Sind alle Pflanzen mit Cytoplasma-Eiweißspindeln Virusträger? Phyton **5**, 189. Zit. nach Küster 1954. — Zepf, E.: Über die Differenzierung des Sphagnumblattes. Z. Bot. **40**, 87—118 (1952). — Ziegler, H.: Untersuchungen über die Leitung und Sekretion der Assimilate. Planta (Berl.) **47**, 447—500 (1956). — Zimmermann, M.: Papierchromatographische Untersuchungen über die pflanzliche Zuckersekretion. Ber. schweiz. bot. Ges. **63**, 402—429 (1953). — Über die Sekretion saccharosespaltender Transglukosidasen im pflanzlichen Nektar. Experientia (Basel) **10**, 145—149 (1954).

Dozent Dr. A. Resch,
Botanisches Institut der Universität Freiburg i. Br., Schänzlestr. 9—11

Planta, Bd. 52, S. 144—172 (1958)

Aus dem Institut für Landwirtschaftliche Botanik der Universität Bonn

URSACHEN DER FROSTRESISTENZ BEI WINTERWEIZEN

I. Mitteilung

DIE BEDEUTUNG DER ZUCKER FÜR DIE FROSTRESISTENZ

Von

ULRICH HEBER

Mit 15 Textabbildungen

(Eingegangen am 31. Mai 1958)

Einleitung

Bei der Erforschung der Frostresistenz wurde sehr frühzeitig gefunden, daß dem Resistenzerwerb meist eine auffällige Erhöhung des Zuckergehaltes parallel geht (MÜLLER-THURGAU 1882, LIDFORSS 1907). Man glaubte anfangs, aus dieser Parallelität einen ursächlichen Zusammenhang zwischen Frostresistenz und Zuckergehalt herleiten zu können, ohne allerdings Sicheres über die Art und Weise einer Verknüpfung aussagen zu können (MAXIMOV 1912, LIDFORSS 1907, NEWTON und BROWN 1931). Bald fiel es jedoch auf, daß der Zuckergehalt durchaus nicht immer mit der Widerstandsfähigkeit gegen Frost parallel ging (HARVEY 1918, KESSLER 1935, KESSLER und RUHLAND 1938). Auch dann, wenn im großen und ganzen Parallelität vorlag, waren im einzelnen nicht zu übersehende Abweichungen festzustellen (TUMANOV 1931, CONSTANTINESCU 1934), so daß vor allem neuerdings eine wesentliche Bedeutung der Zucker für den Resistenzerwerb bestritten wurde (PISEK 1950, 1953; SIMINOVITCH und BRIGGS 1954).

Diese Widersprüche waren für uns der Anlaß, das Problem erneut aufzugreifen. Wir versuchten, auf analytischem Wege möglichst viele Stoffe oder Stoffgruppen der Pflanze zu erfassen, bei denen sich Gehaltsänderungen im Verlaufe des Resistenzerwerbes und -verlustes ergaben, um daraus innerhalb der methodischen Möglichkeiten einen Gesamtüberblick über die eventuellen Ursachen der Frostresistenz zu gewinnen. Weiter führten wir Modellversuche durch. Im vorliegenden Rahmen wird speziell auf die Bedeutung der Zucker für die Frostresistenz eingegangen.

Material und Methode

1. Objekt, Als Objekt der Untersuchung diente Winterweizen, da hier schon Untersuchungen vorlagen (ÅKERMAN 1927, MUDRA 1933, DEXTER 1934, 1935; KNEEN und BLISH 1941; JEREMIAS 1956 u. a.) und ein Anschluß daran möglich schien.

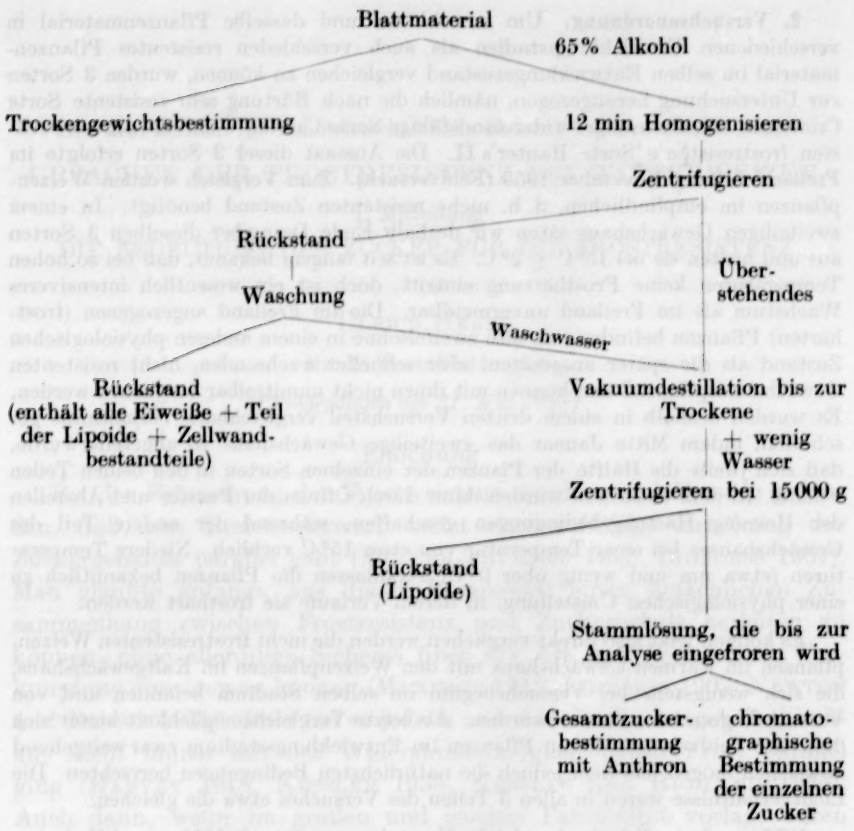
2. Versuchsanordnung. Um sowohl ein und dasselbe Pflanzenmaterial in verschiedenen Entwicklungsstadien als auch verschieden resistentes Pflanzenmaterial im selben Entwicklungszustand vergleichen zu können, wurden 3 Sorten zur Untersuchung herangezogen, nämlich die nach Härtung sehr resistente Sorte Criewener 192, die weniger widerstandsfähige Sorte Carsten V und die am schwächsten frostresistente Sorte Hauter's II. Die Aussaat dieser 3 Sorten erfolgte im Freiland Anfang November 1955 (Feldversuch). Zum Vergleich wurden Weizenpflanzen im empfindlichen, d. h. nicht resistenten Zustand benötigt. In einem zweiteiligen Gewächshaus säten wir deshalb Ende Dezember dieselben 3 Sorten aus und hielten sie bei 15° C ± 2° C. Es ist seit langem bekannt, daß bei so hohen Temperaturen keine Frosthärtung eintritt, doch ist ein wesentlich intensiveres Wachstum als im Freiland unvermeidbar. Die im Freiland angezogenen (frostharten) Pflanzen befinden sich also zweifelsohne in einem anderen physiologischen Zustand als die später ausgesäten, aber schneller wachsenden, nicht resistenten Gewächshauspflanzen und können mit ihnen nicht unmittelbar verglichen werden. Es wurden deshalb in einem dritten Versuchsteil vergleichbare Verhältnisse geschaffen, indem Mitte Januar das zweiteilige Gewächshaus so abgeteilt wurde, daß sich jweils die Hälfte der Planzen der einzelnen Sorten in den beiden Teilen befand. In dem einen Teil wurden dann durch Öffnen der Fenster und Abstellen der Heizung Härtungsbedingungen geschaffen, während der andere Teil des Gewächshauses bei einer Temperatur von etwa 15° C verblieb. Niedere Temperaturen (etwa um und wenig über 0° C) veranlassen die Pflanzen bekanntlich zu einer physiologischen Umstellung, in derem Verlaufe sie frosthart werden.

Es können jetzt also direkt verglichen werden die nicht frostresistenten Weizenpflanzen im warmen Gewächshaus mit den Weizenpflanzen im Kaltgewächshaus, die sich wenigstens bei Versuchsbeginn im selben Stadium befanden und von Versuchsbeginn an resistent wurden. Als letzte Vergleichsmöglichkeit bietet sich dann der Feldversuch, dessen Pflanzen im Entwicklungsstadium zwar weitgehend abweichen mögen, bei dem jedoch die natürlichsten Bedingungen herrschten. Die Lichtverhältnisse waren in allen 3 Teilen des Versuches etwa die gleichen.

1957 wurde im Prinzip der gleiche Versuch angesetzt wie 1956, nur differierten die Zeiten der Aussaat und des Kälteeinbruchs im abgeteilten Gewächshaus um einige Tage. (Die Pflanzen des Feldversuches wurden bereits Mitte Oktober ausgesät.)

3. Zuckeranalyse. Ab Mitte Januar 1956 bzw. ab Anfang Januar 1957 wurden in längeren Zeitabständen Blätter von den Kulturen jeweils bei Tagesanbruch geerntet und aufgearbeitet. In dem Schema ist der Vorgang der Aufarbeitung übersichtlich zusammengefaßt.

Verlauf der Extraktionen. Eine abgewogene Menge der Blätter (etwa 15 g) wurde mit der Schere zerkleinert und mit soviel absolutem Alkohol versetzt, daß die Alkoholkonzentration 65% betrug. Nach Auffüllen mit 65% Alkohol auf etwa 150 ml erfolgte etwa 12 min lang Homogenisieren mit einem „Atommixmill"-Gerät (Werkstatt für Apparatebau, Mülheim/Baden) bei etwa 40000 U/min. Das Homogenisat wurde bei 1400 g zentrifugiert, das Überstehende separiert und der Rückstand mit 65% Alkohol ausgewaschen. Waschflüssigkeit und Überstehendes ließen sich nach Vereinigung durch Vakuumdestillation bei 37° C zur Trockene einengen. Nach dem Aufnehmen mit wenig Wasser wurde die lipoidhaltige Suspension bei 15000 g 20 min auszentrifugiert und der verbleibende Rückstand noch einmal gewaschen. Die vereinigten Lösungen bildeten die Stammlösung für die chromatographische Analyse der einzelnen Zucker und für die Gesamtzuckerbestimmung und wurden bis zur Analyse bei — 20° C eingefroren.



Schema. *Die Aufarbeitung des Pflanzenmaterials*

Vergleichende Untersuchungen zeigten, daß bei einer Lagerung von 6 Monaten bei —20° C weder der Gehalt an einzelnen Zuckern (chromatographische Bestimmung) oder am Gesamtzucker (Anthronbestimmung) noch der Gehalt an Aminosäuren (chromatographische Bestimmung) einer merklichen Änderung unterlag.

Um die an den Stammlösungen erhaltenen Analysenergebnisse auf die Trockengewichte beziehen zu können, bestimmten wir diese parallel zum Aufarbeitungsverfahren im Vakuum bei 45° C.

Zur Gesamtzuckerbestimmung wurde die Stammlösung verdünnt, mit dem Anthronreagens nach MORRIS (1948) versetzt und photometriert. Als Bezugsstandard dienten Saccharoselösungen. Es ist dabei anzunehmen, daß sich der relativ geringfügige Fehler, der aus dem Vorkommen von Monosacchariden und höheren Sacchariden neben der Saccharose im Extrakt resultiert, weitgehend kompensiert und daher vernachlässigt werden kann.

Auf chromatographischem Wege wurden im Extrakt Glucose, Fructose, Saccharose, Raffinose und in sehr geringen Mengen Arabinose gefunden. Vier weitere Zucker konnten auf diesem Wege nicht identifiziert werden. Sie gaben auf dem Papier nach Hydrolyse Ketosenreaktion. Es war daher zu vermuten, daß es sich um Fructosehomologe handelte (s. a. CHARLES 1955). Um sie in Substanz zu isolieren, wurde Stammlösung streifenförmig auf große Chromatographiebogen

aufgetragen und chromatographiert. Die einzelnen Zuckerfronten wurden lokalisiert, ausgeschnitten und mit Wasser eluiert. Der Rückstand des im Vakuum eingedampften Eluats wurde mit n/2 H_2SO_4 im zugeschmolzenen Röhrchen 25 min bei 100° C hydrolysiert und das Hydrolysat direkt auf Papier aufgetragen und chromatographiert, wobei Trennung der Hydrolyseprodukte erfolgte, die als Glucose und Fructose identifiziert wurden. Bei quantitativer Auswertung ergaben sich für drei der unbekannten Zucker Verhältniswerte von Glucose zu Fructose wie 1:1,9, 1:2,5 und 1:3,1. Der vierte Zucker war in zu geringer Menge vorhanden, um zuverlässige Ergebnisse zu liefern. Aus den Verhältniszahlen und den R_f-Werten kann sicher geschlossen werden, daß es sich um ein Glucodifruktosid, ein Glucotrifruktosid und ein Glucotetrafruktosid handelt. Bei der sauren Hydrolyse wird Fructose stärker angegriffen als Glucose, was die niedrigen Fructosewerte erklärt. Der in geringer Menge am langsamsten laufende Zucker könnte analog ein Glucopentafruktosid sein.

Die chromatographische Bestimmung der einzelnen Zucker verlief so, daß etwa 4 mm^3 Stammlösung auf Bogen von Schleicher & Schüllschem Papier Nr. 2043b Mgl (60 × 58 cm) neben Standardzuckerlösungen in genau gleichen Mengen aufgetragen wurden. Butanol-Eisessig-Wasser nach PARTRIDGE (1948) diente als Entwickler. Nach Reaktion der Zucker mit Harnstoff/HCl nach DEDONDER (1952, Ketosenreagens) und Anilinphthalat nach PARTRIDGE (1949, Aldosenreagens) wurden die resultierenden Flecken quantitativ-photometrisch ausgemessen. Da die höheren Fructosehomologe als Reinsubstanzen nicht zur Verfügung standen, sind ihre Analysenwerte auf Raffinose bezogen. Das bedingt zwar einen Fehler im Sinne einer zu hohen Konzentrationsangabe, der aber bei den an sich kleinen Zuckermengen vernachlässigt werden kann.

Nähere Einzelheiten des Verfahrens sind an anderer Stelle mitgeteilt (HEBER 1958b).

Aus verschiedenen Gründen schien es wünschenswert, auch Veränderungen der Zellwandsubstanz zu erfassen. Dazu wurden etwa 20 g mit der Schere zerkleinertes Blattmaterial unter Eiskühlung 12 min lang im alkalischen wäßrigen Milieu homogenisiert. Den p_H-Wert der Lösung hielten wir durch sukzessive Alkalizugabe etwa zwischen 7,5 und 8,5, was bei einiger Übung ohne große Schwierigkeit möglich ist, da das aus den Zellen herausgelöste Eiweiß stark puffert. Ein Arbeiten im schwach alkalischen Milieu ist notwendig, um die Zelleiweiße in Lösung zu halten oder zu bringen, da die sauren Vakuolenbestandteile sonst eine Aggregation und Denaturierung großer Anteile des Zelleiweißes bewirken würden. Diese Anteile würden bei der Eiweißanalyse fehlen und müßten die Zellwandfraktion verfälschen, da sie sich beim Zentrifugieren mit den unlöslichen Zellwandbestandteilen absetzen.

Das Homogenisat wurde bei 1400 g auszentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit, die außer allen löslichen Zellbestandteilen die kolloidal vorliegenden Elemente (unter anderem hochaggregierte Eiweiße der Chloroplasten, das „Chloroplastin" nach STOLL und WIEDEMANN 1938) enthält, wurde durch Glaswolle filtriert, um beim Dekantieren aufwirbelnde Stoffe zurückzuhalten. Die sklerenchymatischen Elemente und der beim Zentrifugieren sedimentierte feiner disperse Rückstand wurden mit schwach alkalischem Wasser über Glaswolle ausgewaschen. Es verblieb eine schwach hellgrün bis gelblich gefärbte Substanz, die sich aus Zellwandbestandteilen zusammensetzte und getrocknet und gewogen wurde. Der Eiweißgehalt der Zellwandfraktion betrug zwischen 6 und 8% (nach KJELDAHL bestimmt).

Die löslichen Zellbestandteile wurden zur Eiweißanalyse weiter aufgearbeitet.

Um zu prüfen, ob sich eventuell Reservezucker der Weizenblätter in unlöslicher Form in der Zellwandfraktion verbergen, war es notwendig, diese einer vorsichtigen Hydrolyse zu unterziehen. 100 mg Zellwandsubstanz wurden dazu mit 2 ml

n/2 H_2SO_4 15 min im zugeschmolzenen Röhrchen auf 100° C erhitzt. Anschließend wurde der nicht hydrolysierte Anteil (Cellulose, Pektine, zum Teil Hemicellulosen) abzentrifugiert. Das Überstehende diente teils zur Gesamtzuckerbestimmung mit Anthron, teils zur chromatographischen Analyse.

Sämtliche in der Untersuchung aufgeführten Analysendaten sind Mittelwerte zweier oder mehrerer Bestimmungen (bis auf die Zellwandbestimmungen, die nur einmal durchgeführt wurden). Die Genauigkeit der Anthronbestimmung dürfte unter ±3%, die der chromatographischen Zuckerbestimmungen unter ±5% (vgl. HEBER 1958b) und die der Zellwandsubstanzbestimmungen etwa zwischen ±5—10% liegen.

4. Bestimmung der Frosthärte. Um nun Vergleiche mit der effektiven Frostresistenz der Pflanzen in den verschiedenen analysierten Stadien ziehen zu können, mußten noch Resistenzbestimmungen durchgeführt werden. Die oben mitgeteilte Versuchsanordnung erlaubt ja nur die qualitative Aussage, daß die im Gewächshaus angezogenen Pflanzen erfahrungsgemäß nicht frostresistent sind, während bei den im Freiland oder unter Freilandbedingungen im Winter wachsenden Pflanzen eine mehr oder minder große Resistenz als gesichert angenommen werden kann. Anfänglich vorgenommene Frostresistenzbestimmungen nach einem von SIMINOVITCH und BRIGGS angegebenen plasmolytischen Verfahren (1953) ergaben keine brauchbaren Ergebnisse. Leider war es im Jahre 1956 aus experimentellen und arbeitstechnischen Gründen nicht möglich, direkte Bestimmungen der Frostresistenz vorzunehmen. 1957 stand dann eine regulierbare Gefrierkammer zur Verfügung, in der Gefrierteste durchgeführt wurden. Die Pflanzen, deren Resistenz bestimmt werden sollte, wurden eingetopft und in zylindrische Pappgefäße von 25 cm Durchmesser und 35 cm Höhe gestellt. Diese wurden verschlossen und so in der Gefrierkammer jeweils $4^1/_2$ Std verschiedenen Temperaturen ausgesetzt. Da die in den Gefäßen eingeschlossene Luft infolge ihrer schlechten Wärmeleitfähigkeit als Puffer wirkte (vgl. ULLRICH und SEEMANN 1943), kühlten die Gefäße nur langsam ab. Nach $4^1/_2$ Std wurde die im Pappgefäß herrschende Temperatur, die immer noch 2—3° C über der der Gefrierkammer lag, abgelesen, worauf sich dann die Pappgefäße 24 Std lang bei 2° C langsam erwärmen konnten. Anschließend standen die Pflanzen 1—2 Tage bei Zimmertemperatur, ehe wir sie makroskopisch auf Frostschäden prüften. Als Maß der jeweiligen Frostresistenz diente die Temperatur, bei der etwa 50% der Pflanzen überlebten. Wenn z. B. bei einer bestimmten Temperatur eine lethale Schädigung von 80% eintrat und bei der darunter folgenden Temperaturstufe eine solche von 20%, wurde auf die dazwischen liegende Temperatur interpoliert. Solche Resistenzbestimmungen waren recht gut reproduzierbar.

5. Modellversuche. Um die protektive Wirkung von Zuckern am definierten Substrat zu untersuchen, führten wir Gefrierversuche mit Plasmaeiweißlösungen unter Zusatz verschiedener Zucker durch. Betreffs der Methodik sei auf ULLRICH und HEBER (1958) verwiesen.

Ergebnisse

1. Die Untersuchung des Zuckerspiegels. Die in der Literatur festgehaltenen widersprüchlichen Befunde erforderten zunächst eine nochmalige Prüfung, *ob* eine Korrelation zwischen Frostresistenz und Zuckergehalt besteht. Weiterhin aber legten sie den Gedanken nahe, daß von allen Zuckerarten — wenn sie überhaupt schützend wirken — möglicherweise nur *wenige, ganz bestimmte* eine Rolle als Schutzstoffe bei der Frostresistenz spielen könnten. Bei allen bisherigen Untersuchungen

wurden entweder osmotische Werte oder aber der Gesamtzucker, allenfalls in reduzierende und nicht-reduzierende Zucker aufgeteilt, bestimmt. Die Höhe des Spiegels der *einzelnen* Zucker ist bisher noch nicht festgehalten worden, obwohl Rosa (1920) eine Theorie aufstellte, nach der speziell Pentosane für die Resistenz gegen Frost verantwortlich seien. Die Annahme, daß nur wenige bestimmte Zucker schützend gegen Frost wirken, könnte auch die Differenzen der bisherigen Befunde erklären, denn auch bei hohem Gehalt an wirksamen Zucker kann dann der Gesamtzuckergehalt niedrig sein und umgekehrt. So könnte eine mangelnde Korrelation vorgetäuscht werden.

Abb. 1 zeigt die Höhe des Gesamtzuckerspiegels bezogen auf die Trockensubstanz der Blätter beim Versuchsansatz 1957, der in gleicher Weise verlief wie im Jahre 1956. Auch hier wird vergleichend neben dem Feldversuch ein Gewächshausversuch betrachtet, der sich seinerseits aufteilt in einen Härtungsversuch (Gewächshausversuch kalt) und in einen Kontrollversuch mit ungehärtetem Material (Gewächshausversuch warm). In Abb. 2 ist der Temperaturverlauf während der Versuchszeit 1957 dargestellt. Durch Ausgleich der an den einzelnen Tagen teilweise recht schwankenden Minimum- und Maximumtemperaturen ist der Kurvenverlauf vereinfacht worden, um einen besseren Überblick zu ermöglichen. Abb. 3 gibt den experimentell festgehaltenen Resistenzverlauf im Jahre 1957 wieder. Als Maß der Resistenz dient die Temperatur, bei der 50% der Blätter den Gefriervorgang überlebten (in °C auf der Ordinate angegeben). Aus dem Vergleich der Abb. 1 und 3 folgt, daß die Übereinstimmung zwischen dem Gehalt an Zuckern und dem Resistenzverlauf beim Pflanzenmaterial des kalt gestellten Gewächshauses (Gewächshausversuch kalt), das vom Kälteeinbruch an einer Frosthärtung unterworfen war, außerordentlich gut ist. Auf der anderen Seite ist beim Gewächshausversuch „warm" (ungehärtetes Material) trotz einer Zunahme der Zucker keine wesentliche Resistenzerhöhung zu verzeichnen. Beim Feldversuch schließlich ist die Übereinstimmung zwischen Gesamtzuckergehalt und Resistenzgrad nur geringfügig. Geradezu auffallend ist die Anfang April stattfindende starke Zuckerakkumulation bei gleichzeitigem Resistenzschwund. In dieser Zeit war die Winterruhe bereits unterbrochen.

Bei diesen Versuchsansätzen, die mit dem gleichen Pflanzenmaterial vorgenommen wurden, konnten also sowohl Übereinstimmungen zwischen Gesamtzuckerspiegel und Resistenzverlauf als auch nicht übersehbare Abweichungen festgestellt werden.

In Abb. 4 ist die Höhe des Zuckerspiegels bezogen auf das Trockengewicht der Blätter für das Versuchsjahr 1956 aufgezeichnet. Abb. 5 gibt den Temperaturverlauf im harten Winter 1956 in vereinfachter Darstellung an. Wie schon erwähnt, bestand 1956 keine Möglichkeit,

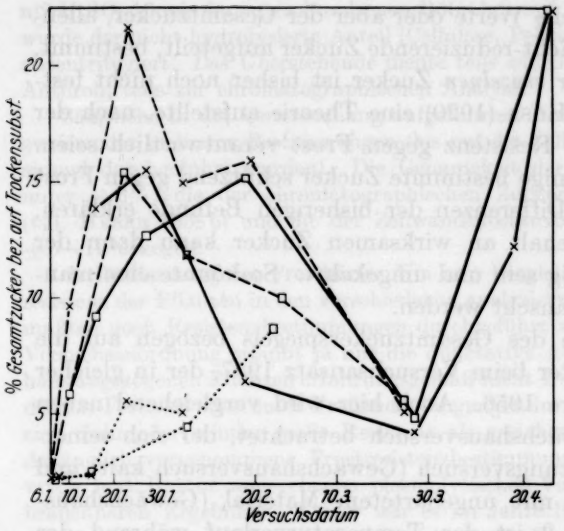


Abb. 1

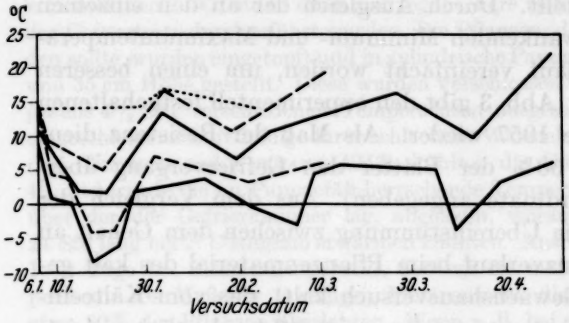


Abb. 2

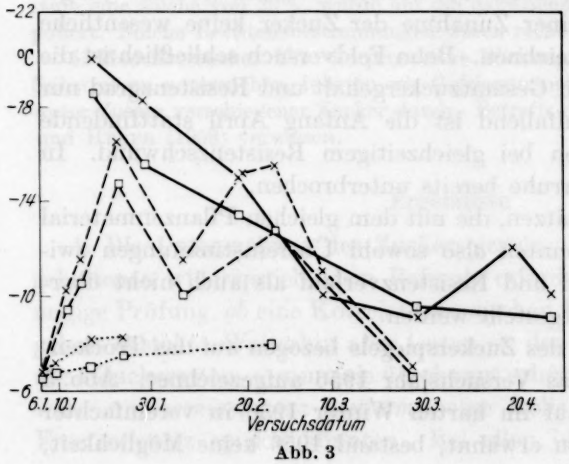


Abb. 3

die Änderungen in der Resistenz der einzelnen Sorten unter den verschiedenen Bedingungen exakt experimentell festzuhalten. Auf Grund der in der großen Kälteperiode aufgetretenen Frostschäden und des Temperaturverlaufs, der ja auf die Resistenzausbildung Einfluß nimmt (vgl. Gewächshausversuch kalt in Abb. 2 und 3) sowie auf Grund des Wachstumsverhaltens der Pflanzen versuchten wir, Resistenzkurven zu

Abb. 1. Die Höhe des Gesamtzuckerspiegels im Versuchsjahr 1957. ——— Feldversuch; – – – – Gewächshausversuch kalt; ····· Gewächshausversuch warm (Kontrolle); × Criewener 192; □ Hauter's II

Abb. 2. Temperaturverlauf während der Versuchsperiode 1957, vereinfacht. ——— Feldversuch, obere Kurve: Temperaturmaximum in 2 m Höhe über dem Boden; untere Kurve: Temperaturminimum in 5 cm Höhe über dem Boden. – – – – Gewächshausversuch kalt, obere Kurve: Temperaturmaximum in 20 cm Höhe über dem Boden; untere Kurve: Temperaturminimum in gleicher Höhe. ------- Gewächshausversuch warm: Temperaturdurchschnitt in 20 cm Höhe über dem Boden

Abb. 3. Resistenzverlauf während der Versuchsperiode 1957 (im Vergleich zu Abb. 1). ——— Feldversuch; – – – Gewächshausversuch kalt; ····· Gewächshausversuch warm; × Criewener 192; □ Hauter's II. Ordinate: Temperatur, bei der 50 % der Blätter überlebten. Abszisse: Zeiten der Probeentnahme

konstruieren (Abb. 6). Bei den extremen Temperaturen im Februar und Anfang März 1956 traten sowohl auf dem Felde als auch im Kaltgewächshaus vor allem bei den Sorten Hauter's II und Carsten V starke Erfrierungsschäden auf, die zur Charakterisierung der Frostresistenz herangezogen wurden. Bald nach Aufhören der großen Kälteperiode setzte ein intensives Wachstum der Pflanzen ein, wobei die Frostresistenz sprungartig sinken mußte, wie auch die Beobachtungen im Jahre 1957 im Vergleich mit dem Resistenzverhalten ergaben (vgl. KESS-

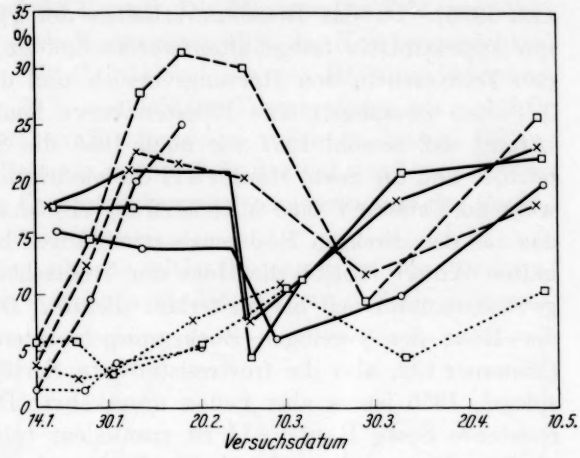


Abb. 4

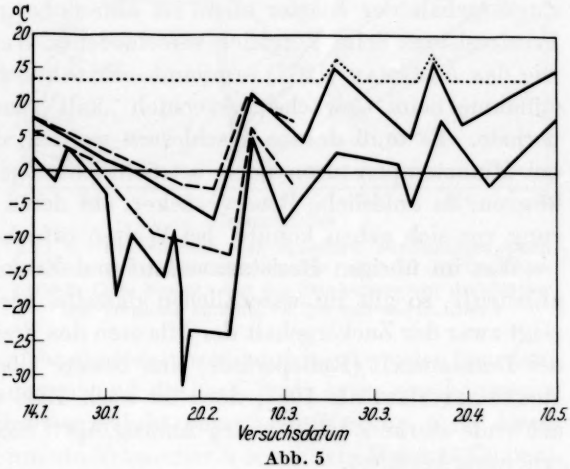


Abb. 5

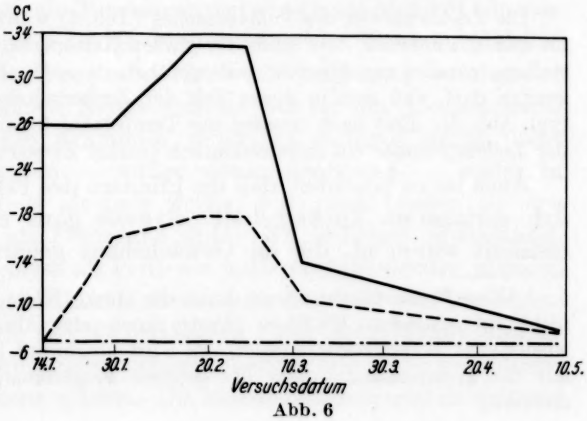


Abb. 6

Abb. 4. Die Höhe des Gesamtzuckerspiegels im Versuchsjahr 1956 in Prozent des Trockengewichtes der Blätter (Anthronbestimmung). ——— Feldversuch; – – – Gewächshausversuch kalt; × Criewener 192; □ Hauter's II; ○ Carsten V. (Aus ULLRICH und HEBER 1957, verändert)

Abb. 5. Temperaturverlauf während der Versuchsperiode 1956, vereinfacht. Zeichen wie in Abb. 2

Abb. 6. Resistenzverlauf während der Versuchsperiode 1956 (im Vergleich zu Abb. 4). ——— Feldversuch; – – – – Gewächshausversuch kalt; ·—·—· Gewächshausversuch warm

LER 1935). Da das Resistenzverhalten der Pflanzen auf diese Weise nur approximativ festgehalten werden konnte, wurde nur jeweils für den Feldversuch, den Härtungsversuch und den Kontrollversuch der 3 Sorten zusammen eine Resistenzkurve konstruiert. Es sei jedoch betont, daß sowohl 1957 wie auch 1956 die Sorte Criewener 192 die höchste und die Sorte Hauter's II die niedrigste Frostresistenz aufwies, während Carsten V eine Mittelstellung einnahm. Im Jahre 1957 geht das aus den direkten Resistenzbestimmungen hervor, während im sehr kalten Winter 1955/56 die Höhe der Frostschäden im Feld- und Kaltgewächshausversuch als Kriterium diente[1]. Das ist besonders wegen der Höhe des jeweiligen Zuckerspiegels interessant: 1957 hat zwar Criewener 192, also die frostresistenteste Sorte, den höchsten Zuckerspiegel, 1956 ist es aber genau umgekehrt: Die am wenigsten frostresistente Sorte Hauter's II ist zumindest beim Gewächshausversuch „kalt" mit einem besonders hohen Zuckergehalt ausgestattet. Aus dem Zuckergehalt der Blätter allein ist also sicher nicht auf den Grad der Frostresistenz beim Vergleich verschiedener Weizensorten zu schließen, wie das ÅKERMAN (1927) annimmt. Erstaunlich ist die starke Zuckerzunahme beim Gewächshausversuch „kalt" auch während der Kälteperiode. Es muß daraus geschlossen werden, daß die Pflanzen selbst bei Minustemperaturen noch beträchtliche Zuckermengen assimilieren können, da unlösliche Reservezucker, auf deren Kosten diese Anreicherung vor sich gehen könnte, bei Weizen offenbar nicht existieren.

Was im übrigen Resistenzverlauf und Zuckergehalt im Jahre 1956 anbetrifft, so gilt im wesentlichen dasselbe wie im Versuch 1957. Es zeigt zwar der Zuckergehalt der Pflanzen des Freilandversuches während der Dormanzzeit (Ruheperiode) eine bessere Übereinstimmung mit dem Resistenzverlauf als 1957, doch ist auch 1956 der allgemein zu beobachtende starke Zuckeranstieg Anfang April nicht von einer Resistenzerhöhung begleitet.

Die Zuckerkurven des Feldversuches (Abb. 4) wurden von der 2. Messung an bis zum 27. Februar, dem Ende der großen Kälteperiode, in der graphischen Darstellung parallel zur Abszisse weitergeführt, da auch ohne Messung angenommen werden darf, daß sich in dieser Zeit der Zuckergehalt nicht wesentlich änderte (vgl. Abb. 5). Erst nach Anstieg der Temperatur konnte mit der Intensivierung der Lebensprozesse ein außerordentlich starker Zuckerverbrauch einsetzen.

Auch ist zu beachten, daß die Pflanzen des Feldversuches bei wesentlich geringerem Zuckergehalt zeitweise ganz erheblich stärker frostresistent waren als die im Gewächshaus gehärteten. Besonders auf-

[1] Diese Frostschäden waren durch die starke Kälte direkt bedingt und gehen nicht auf sekundäre Einflüsse (Austrocknen oder Abreißen der Wurzeln durch wiederholte Bodenfröste) zurück. Es wird überhaupt in diesem Zusammenhang nur die Frostresistenz, nicht der größere Fragenkomplex der Winterfestigkeit erörtert.

fällig tritt das im Februar 1956 hervor. Die Pflanzen des Feldversuches ertrugen bei einem Zuckergehalt von etwa 18% des Trockengewichtes eine Temperatur unter —30° C, während die des Härtungsversuches bei Zuckergehalten über 25% nur höhere Temperaturen als —15° C aushielten. Die aufgetretenen Frostschäden waren in beiden Fällen etwa gleich. Alle diese Befunde zeigen ganz deutlich, daß eine *direkte* Proportionalität zwischen Gesamtzuckergehalt einerseits und der Frostresistenz andererseits nicht besteht.

Es war nun festzustellen, ob eine solche Beziehung bei den einzelnen Zuckern zu finden ist. Es besteht ja die Möglichkeit, daß die gelegentlichen Abweichungen von einer Parallelität zwischen Zuckergehalt und Frostresistenz dadurch zustande kommen können, daß wirksame Zucker bisweilen durch unwirksame Zucker „maskiert" werden.

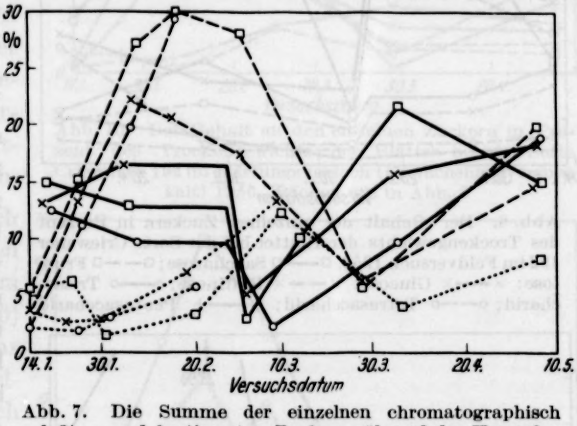


Abb. 7. Die Summe der einzelnen chromatographisch erfaßten und bestimmten Zucker während der Versuchsperiode 1956, bezogen auf das Trockengewicht der Blätter (im Vergleich zu Abb. 4). Zeichen wie in Abb. 4

Eine Auftrennung der Zucker war nur auf chromatographischem Wege möglich. Dabei ergaben sich jedoch Schwierigkeiten. Es traten Zucker auf, die nicht ohne weiteres identifiziert werden konnten. Erst die Isolierung als Substanz und die nach Hydrolyse vorgenommene Identifizierung der Hydrolyseprodukte ergab Aufklärung über deren Natur. Es handelte sich um ein Trisaccharid aus einem Molekül Glucose und 2 Molekülen Fructose, ein Tetrasaccharid aus einem Molekül Glucose und 3 Molekülen Fructose und ein Pentasaccharid mit einem Molekül Glucose und 4 Molekülen Fructose. Ein noch langsamer wandernder Zucker, der in sehr kleiner Menge auftrat, dürfte ein Hexasacharid sein. Er wurde, wie auch Arabinose, wegen zu geringer Menge nicht bestimmt. Pentosen traten — außer wenig Arabinose — weder in analytisch faßbarer Menge als freie Zucker auf, noch fanden sie sich in wesentlicher Menge als Pentosane unter den löslichen Zellbestandteilen, wo sie nach Hydrolyse als Pentosen hätten erfaßt werden müssen. Dies dürfte ein eindeutiger Hinweis darauf sein, daß Pentosen im Gegensatz zur Pentosantheorie der Frostresistenz von Rosa (1920) und zu der von Jeremias (1956) ausgesprochenen Vermutung keine wesentliche Rolle bei der Frostresistenz spielen. Die im Feldversuch und in späteren

Stadien des Gewächshausversuches in geringer Menge auftretenden Fructosane wurden nicht auf direktem Wege bestimmt. Sie ergaben sich mengenmäßig aus der Differenz der chromatographisch erfaßten Zucker zur Gesamtzuckerbestimmung, die nach der Anthronmethode vorgenommen wurde. Die Summe der chromatographisch erfaßten Zucker ist in Abb. 7 dargestellt. Die Werte befinden sich in sehr guter Übereinstimmung mit der Gesamtzuckerbestimmung (Abbildung 4), woraus hervorgeht, daß die Genauigkeit der chromatographischen Zuckerbestimmungen recht hoch ist. Wesentliche Abweichungen ergeben sich nur dort, wo auf chromatographischem Wege Fruktosane festgestellt wurden, die in der Summe der chromatographischen Bestimmungen ja nicht enthalten sind. Auf die Darstellung des Gehaltes an Fruktosanen wurde verzichtet, da der Fruktosangehalt offenbar nicht in Beziehung zur Frostresistenz steht, worauf noch eingegangen wird (S. 158). Abb. 8 zeigt die Kurven der einzelnen Zucker bei der Weizensorte Criewener 192, Abb. 9 bei Hauter's II im Feldversuch 1956. Wie bereits erwähnt, konnte der Zuckergehalt von der zweiten Messung an bis zum Ende der großen Kälteperiode als konstant angenommen werden.

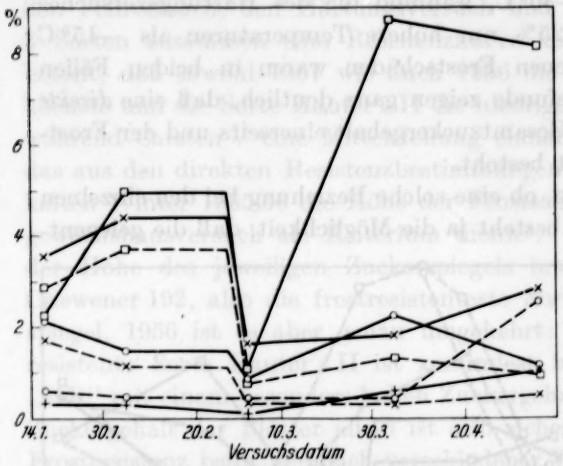


Abb. 8. Der Gehalt der einzelnen Zuckern in Prozent des Trockengewichts der Blätter bei der Sorte Criewener 192 im Feldversuch 1956. □——□ Saccharose; □– –□ Fructose; ×——× Glucose; ×– –× Raffinose; ○——○ Trisaccharid; ○– –○ Tetrasaccharid; +——+ Pentasaccharid

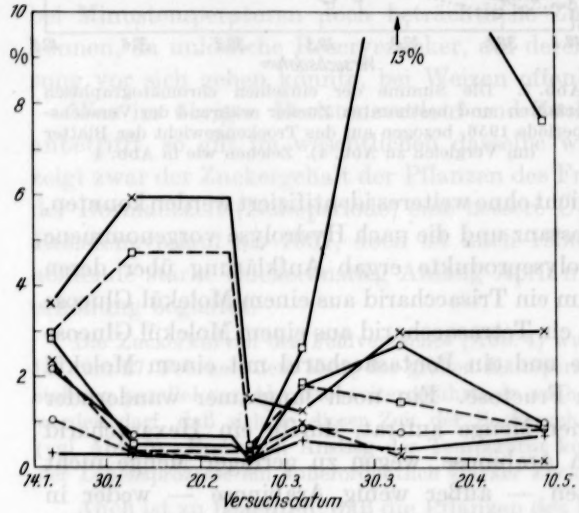


Abb. 9. Der Gehalt an den einzelnen Zuckern in Prozent des Trockengewichts der Blätter bei der Sorte Hauter's II im Feldversuch 1956. Zeichen wie Abb. 8

Die Abb. 10 und 11 geben die Gehalte an den einzelnen Zuckern ebenfalls bei Criewener 192 und Hauter's II im Gewächshausversuch „kalt" wieder, während Abb. 12 dieselben Verhältnisse bei Hauter's II im Gewächshausversuch „warm" zeigt. Auf die Wiedergabe weiterer Kurven (Carsten V, Criewener 192) wurde verzichtet, da sie im Wesentlichen ähnlich verlaufen.

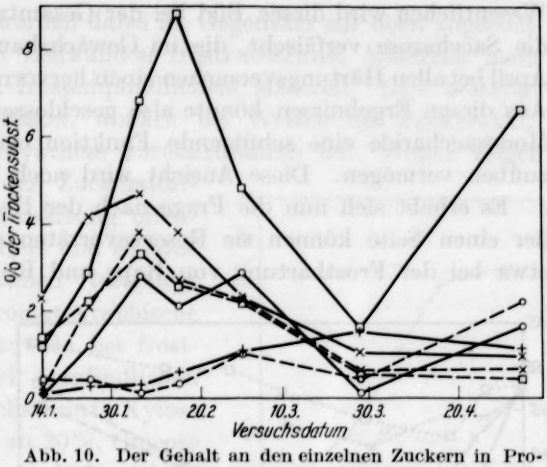


Abb. 10. Der Gehalt an den einzelnen Zuckern in Prozent des Trockengewichts der Blätter bei der Sorte Criewener 192 im Härtungsversuch (Gewächshausversuch kalt) 1956. Zeichen wie in Abb. 8

Aus dem Vergleich der oben angegebenen Zucker-Kurven mit dem Resistenzverlauf (Abb. 6) ergibt sich ein Bild, das von dem abweicht, welches wir beim Vergleich des Gesamtzuckergehaltes mit der Resistenzkurve gefunden hatten. Der Gehalt an Glucose und Fructose weist weit deutlichere Parallelen mit dem Resistenzverlauf auf als der Gesamtzuckergehalt. Auch der Menge der Monosaccharide nach entsprechen sich jetzt Resistenz im Feldversuch und im Gewächshausversuch besser. Im April ist bei gleichzeitigem Resistenz verlust eine nur unwesentliche Monosaccharidanhäufung zu verzeichnen. Im

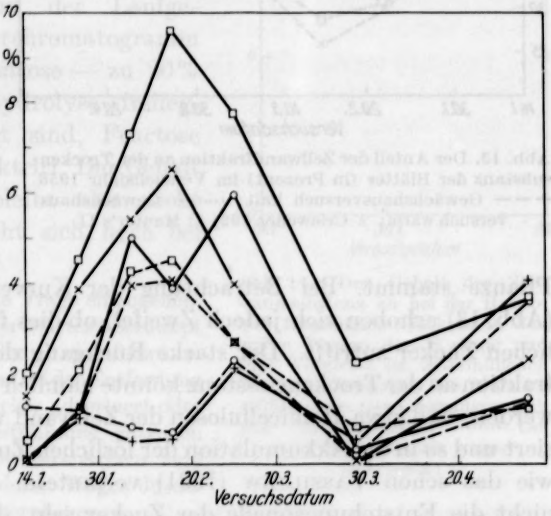


Abb. 11. Der Gehalt an den einzelnen Zuckern in Prozent des Trockengewichts der Blätter bei der Sorte Hauter's II im Gewächshausversuch kalt 1956. Zeichen wie in Abb. 8

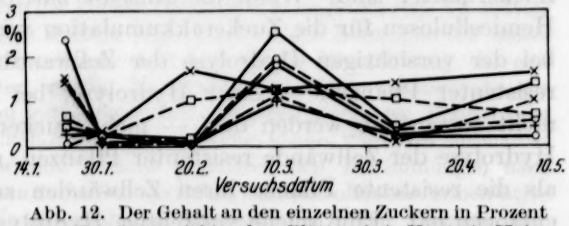


Abb. 12. Der Gehalt an den einzelnen Zuckern in Prozent des Trockengewichts der Blätter bei Hauter's II im Kontrollversuch (Gewächshaus warm) 1956. Zeichen wie in Abb. 8

Wesentlichen wird dieses Bild bei der Gesamtzuckerbestimmung durch die Saccharose verfälscht, die im Gewächshausversuch „kalt" und ab April bei allen Härtungsversuchen einen hervorragenden Platz einnimmt. Aus diesen Ergebnissen könnte also geschlossen werden, daß vor allem Monosaccharide eine schützende Funktion bei der Frostresistenz auszuüben vermögen. Diese Ansicht wird noch diskutiert werden.

Es erhebt sich nun die Frage nach der Herkunft der Zucker. Auf der einen Seite können sie Reservevorräten entstammen — so wird etwa bei der Frosthärtung von Raps und Rübsen (HELLSTRÖM 1954) oder bei der Robinie (SIMINOVITCH und BRIGGS 1954) Stärke in Zucker umgewandelt — oder aber sie können von der Pflanze neu gebildet werden.

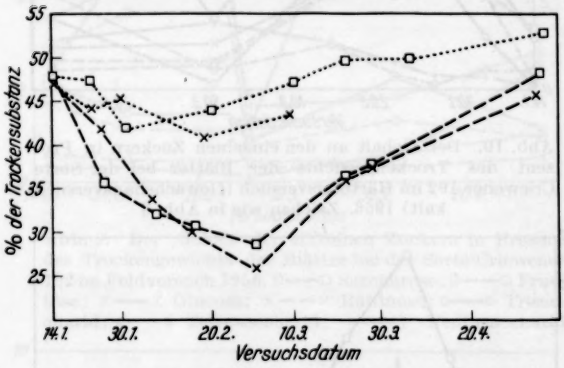


Abb. 13. Der Anteil der Zellwandfraktion an der Trockensubstanz der Blätter (in Prozent) im Versuchsjahr 1956. — — — Gewächshausversuch kalt; ····· Gewächshausversuch warm; × Criewener 192; □ Hauter's II

In einer ausgezeichneten Arbeit konnte ANDERSSON (1944) an Hand des CO_2-Verbrauches von Weizenpflanzen zeigen, daß der akkumulierte Zucker aus einer photosynthetischen Leistung der Pflanze stammt. Bei Betrachtung der Kurven der Zellwandfraktion (Abb. 13) erhoben sich jedoch Zweifel, ob dies für alle auftretenden löslichen Zucker zutrifft. Der starke Rückgang des Anteils der Zellwandfraktion an der Trockensubstanz könnte nämlich partiell auch so gedeutet werden, daß etwa Hemicellulosen der Zellwand von der Pflanze hydrolysiert und so in die Akkumulation der löslichen Zucker einbezogen werden, wie das schon VASSILJEW (1931) vermutete. Reservestärke kann ja nicht die Entstehungsquelle der Zucker sein, da Weizenblätter nur in den Schließzellen eine unbeträchtliche Menge Stärke bilden, also typische Zuckerblätter sind. Wenn die Ansicht zutrifft, daß ein Abbau von Hemicellulosen für die Zuckerakkumulation verantwortlich ist, müssen bei der vorsichtigen Hydrolyse der Zellwandbestandteile nicht frostresistenter Pflanzen — einer Hydrolyse, bei der Cellulose natürlich nicht angegriffen werden darf — mehr Zucker freiwerden als bei der Hydrolyse der Zellwände resistenter Pflanzen, nämlich umsoviel mehr, als die resistente Pflanze ihren Zellwänden zur Zuckerakkumulation entzogen hat. Eine solche vorsichtige Hydrolyse wurde mit n/2 H_2SO_4 in 15 min bei 100° C durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 14

dargestellt. Tatsächlich werden dabei im Gegensatz zur oben angestellten Überlegung aus den Zellwänden frostresistenten Materials mehr Zucker freigelegt als bei frostempfindlichem Material. Dies bestätigt die Befunde von ANDERSSON, wonach bei Weizen die Zuckerakkumulation nur auf Photosynthese zurückzuführen ist. Weiter zeigen diese Ergebnisse, daß der Zuckerstoffwechsel während der Frosthärtung offenbar außerordentlich luxuriert und so noch Zucker in den Zellwänden festgelegt werden können. Chromatographische Bestimmungen ergaben sowohl bei frostresistenten als auch bei empfindlichen Pflanzen, daß im Durchschnitt Xylose zu etwa 40%, Arabinose zu 20%, Glucose und Galaktose zusammen zu 15% und ein unbekannter Zucker — auf Grund des Reaktionsverhaltens und der Laufgeschwindigkeit im Papierchromatogramm wahrscheinlich eine Dipentose — zu 20% an den durch Säurehydrolyse freilegbaren Zuckern beteiligt sind, Fructose dagegen sehr stark zurücktritt. Der Gehalt an Zellwandsubstanz bleibt also nicht konstant, sondern erhöht sich noch bei der Härtung.

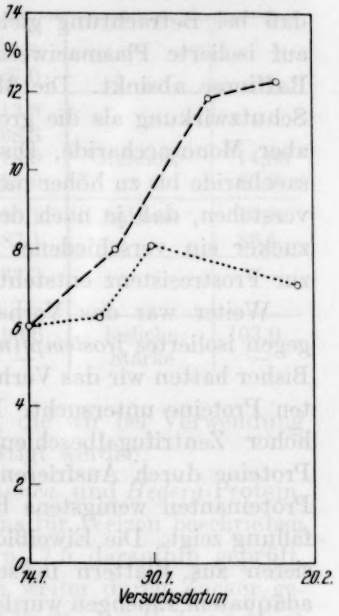


Abb. 14. Der Gehalt der Zellwandsubstanz an bei der Hydrolyse freigelegten Zuckern in den ersten Phasen der Härtung und zum Vergleich im empfindlichen Zustand (Criewener 192, Versuch 1956). — — — Gewächshausversuch kalt (Frosthärtung); ····· Gewächshausversuch warm (Kontrolle)

Es ist noch kurz auf die Frage einzugehen, inwieweit der Zuckergehalt der Blätter überhaupt quantitativ erfaßt wurde, oder ob nicht etwa im Trennungsgang, beispielsweise bei der Entfernung der Eiweiße, ein Teil der Zucker adsorbiert oder mitgerissen und so der Bestimmung entzogen wurde. Deshalb wurden Zuckeranalysen zum Teil auch noch auf zwei anderen Wegen durchgeführt und die Ergebnisse verglichen:

Blätter wurden in Wasser homogenisiert und daraus die Eiweiße durch Erhitzen ausgefällt. Nach dem Einengen der Lösung erfolgte eine chromatographische und eine Anthron-Bestimmung der Zucker. Weiterhin homogenisierten wir Blätter in schwach alkalisch-wäßrigem Medium (vgl. S. 147). Nach Abtrennen der unlöslichen Zellwandbestandteile resultierte eine dunkelgrüne Eiweißlösung, die eingeengt und chromatographiert wurde. Es ergaben sich Gesamtzuckerwerte, die denen der Alkoholextraktion gut entsprachen. Dagegen waren bei Betrachtung der einzelnen Zucker nach Alkoholextraktion vor allem höhere Werte bei Saccharose und niedrigere bei Fructose und Glucose gegenüber den Bestimmungen nach Extraktion im wäßrigen Milieu zu finden. Es haben sich also offenbar fermentative Umwandlungen bei der Wasserextraktion abgespielt, in deren Verlaufe Saccharose hydrolysiert wurde. Die *Summe* der chromatographischen Einzelzuckerbestimmungen stimmte jedoch bei allen Extraktionsweisen befriedigend überein.

Es läßt sich also sagen, daß die oben mitgeteilten Zuckeranalysen den freien Zuckeranteil der Pflanze recht zuverlässig wiedergeben.

2. Die Schutzwirkung von Zuckern auf Plasmaeiweiße. Im Vorstehenden wurde gezeigt, daß der Gehalt an Monosacchariden bei einigen Versuchen dem Resistenzverlauf besser folgt als der Gehalt an Gesamtzucker. Ullrich und Heber (1958) haben nun gefunden, daß bei Betrachtung gleicher Mengen an Zucker die Schutzwirkung auf isolierte Plasmaeiweiße im Gefrierversuch von der Fructose zur Raffinose absinkt. Die Monosaccharide haben also auch eine bessere Schutzwirkung als die großen Zucker. In der Weizenpflanze kommen aber Monosaccharide, Disaccharide, Trisaccharide und weitere Oligosaccharide bis zu höher molekularen Fruktosanen vor. Es läßt sich also verstehen, daß je nach dem Anteil der einzelnen Zucker am Gesamtzucker ein verschiedenes Bild von der Relation des Zuckergehaltes zur Frostresistenz entsteht.

Weiter war das Verhalten verschiedener Zucker vor allem auch gegen isoliertes *frostempfindliches* Protein im Gefrierversuch zu prüfen. Bisher hatten wir das Verhalten des insgesamt aus dem Blatt extrahierten Proteine untersucht. Es stellte sich dann heraus, daß nur die bei hoher Zentrifugalbeschleunigung (20000—25000 g) sedimentierbaren Proteine durch Ausfrieren gefällt werden, während der überstehende Proteinanteil wenigstens bei p_H-Werten um und über 7 keine Frostfällung zeigt. Die Eiweißlösungen wurden wie bisher durch Homogenisieren aus Blättern in schwach alkalischem Milieu erhalten. Nach adäquatem Einengen wurde daraus die frostempfindliche Fraktion durch 2stündiges Zentrifugieren bei 20000 g sedimentiert, in Phosphatpuffer von p_H 7,2 aufgenommen, durch 5minütiges Zentrifugieren bei 4000 g von denaturierten Anteilen befreit und anschließend 3 Tage gegen Phosphatpuffer von p_H 7,2 dialysiert.

Zu der von anderen Stoffen befreiten frostempfindlichen Proteinfraktion wurden die zu prüfenden Zucker in verschiedenen Mengenverhältnissen gegeben und die Lösungen bei —20° C 24 Std eingefroren. Nach dem Auftauen bestimmten wir die Menge an denaturiertem Protein. In Tabelle 1 sind die Ergebnisse derartiger Schutzversuche dargestellt. Die Schutzwirkung der Zucker nimmt mit Erhöhung des Molekulargewichtes ab. Inulin als Beispiel für ein Fruktosan weist überhaupt keine merkliche Schutzwirkung mehr auf. Vom Protein wird sogar Polysaccharid bei der Aggregation mitgerissen, wie aus den Frostfällungswerten zu ersehen ist, die teilweise den Gesamteiweißgehalt der Lösung beträchtlich übersteigen (vgl. v. Przylecki und Majmin 1931). Auf Grund dieses Befundes wurde auf eine analytische Darstellung des Fruktosangehaltes verzichtet (s. S. 154): Den Polysacchariden kommt offenbar keine Bedeutung als Frostschutzagens zu.

Tabelle 1. *Die Schutzwirkung verschiedener Zucker gegenüber der frostempfindlichen Proteinfraktion im Gefrierversuch. Proteinkonzentration der Lösung 2%, Einfrieren 24 Std bei —20° C*

Zuckerkonzentration der Lösung in %	Durch Frostwirkung denaturierte Eiweiße in % des Gesamteiweißes					
8	Ribose	10,12	Arabinose	11,1		
4		63,3		67,0		
8	Fructose	16,4	Sorbose	13,9		
4		68,5		68,3		
8	Galaktose	15,4	Glucose	18,0	Mannose	14,80
4		69,2		57,0		66,8
8	Saccharose	22,1	Maltose	23,1	Laktose	17,8
4		89,2		87,1		86,1
2	Raffinose	32,8	Melizitose	37,3		
4		91,7		—		
8	Inulin	112,0	Dextrin	93,6	lösliche	103,0
4		—		—	Stärke	—

Mit diesen Ergebnissen können die Befunde, die wir bei Verwendung ungereinigter Proteinlösungen erhielten, bestätigt werden.

Weiter wurde unfraktioniertes *Pinus*-, *Brassica*- und *Hedera*-Protein, das in gleicher Weise gewonnen wurde, wie das für Weizen beschrieben ist, nach Dialyse gegen Veronalpuffer von p_H 7,5 daraufhin geprüft, ob es einmal durch Frost ausfrierbar ist und weiter durch Zucker geschützt werden kann. Beides ist der Fall (Tabelle 2). Bei *Hedera* scheint

Tabelle 2. *Die Schutzwirkung von Saccharose gegenüber Proteinen verschiedenen Ursprungs im Gefrierversuch. Einfrieren 24 Std bei —20° C*

Protein aus	Denaturiertes Eiweiß in % des Gesamteiweiß ohne Zucker	Denaturiertes Eiweiß in % des Gesamteiweiß mit 3,84 % Saccharose in der Lösung	Eiweißgehalt in % der Lösung
Pinus silvestris . .	71	38,0	4,5
Brassica oleracea .	35	5,0	2,0
Hedera helix . . .	10	0,6	2,4

aber weiterhin ein Körper vorhanden zu sein, der sich durch Dialyse nicht entfernen läßt und frostschützend wirkt, da die Menge des frostdenaturierten Proteinanteils bemerkenswert geringer war als bei den Proteinen der anderen Pflanzenarten.

Zusammenfassend sei gesagt, daß die auf die Gewichtseinheit bezogene Schutzwirkung von den Monosacchariden zu den Polysacchariden hin

abnimmt und schon bei mäßiger Molekulargröße keine Rolle mehr spielen dürfte. Die Schutzwirkung von Zucker im Gefrierversuch ist nicht nur auf Weizenprotein beschränkt. Sie läßt sich auch bei extrahierten Proteinen anderer Pflanzen beobachten.

Diskussion

1. Der Mechanismus der Zuckerschutzwirkung. Als Frostresistenz wird im besonderen die Fähigkeit von Pflanzen vorwiegend winterkalter Klimate bezeichnet, tiefe Temperaturen, bei denen Eisbildung auftritt, ohne Schädigung zu ertragen. Diese Frostresistenz ist nicht ständig ausgebildet. Erst bei Temperaturen nahe am Gefrierpunkt gehen Veränderungen in der Pflanze vor, in deren Verlauf sie befähigt wird, unter anderem die weitgehende Entwässerung des Plasmas durch Eisbildung lebend zu überstehen (betreffs Literatur vgl. die Zusammenstellungen von Ullrich 1943, Scarth 1944 und Levitt 1952 und 1956). Diese geht unter natürlichen Verhältnissen in den Intercellularen vor sich (Sachs 1860 u. a.). Sie wird gespeist durch Wasser, das dabei der Vacuole und dem Plasma entzogen wird. Überschreitet dieser Wasserentzug ein bestimmtes Maß, so tritt Frostschaden ein.

Worin besteht nun dieser Frostschaden und wie äußert er sich? Der Tod der Zelle kann ja nur der sekundäre Ausdruck einer Schädigung sein. Experimentelle Untersuchungen über die primäre Auswirkung des Frostes im einzelnen fehlen weitgehend. Es wird lediglich gesagt, daß übermäßige Dehydration des Plasmas zum Frosttod führt (Müller-Thurgau 1886 u. a.). Iljin (1933, 1934, 1935) und Levitt (1956) nehmen als Ursache des Frosttodes mechanische Einwirkungen an, während Lidforss (1907), Fuchs (1935) und Ullrich und van Veen (1942) vermuten, daß die zerstörende Wirkung des Frostes und des damit verbundenen Wasserentzuges direkt auf einer Denaturierung von Plasmaeiweißen beruht. Diese Ansicht wurde von Lidforss (1907) sowie Ullrich und Heber (1957, S. 724) experimentell gestützt. (Weitere Erörterung erfolgt an anderer Stelle.) Wenn sie richtig ist, ist also die Frage nach den Ursachen der Frostresistenz gleichzeitig die Frage danach, wie die Pflanze diese Denaturierung verhindert.

Wir mußten nun — ebenso wie andere Autoren vor uns — vermuten, daß Zucker bei der Frostresistenz eine wesentliche Rolle spielen (Ullrich und Heber 1957). Eine kausale Klärung der Frage nach der Bedeutung der Zucker oder bestimmter Zucker läßt sich aus einem Vergleich des Zuckerspiegels der Pflanze mit ihrer Frostresistenz nicht gewinnen. Es sind jedoch solche Vergleiche nötig, um abschätzen zu können, ob eine Schutzfunktion der Zucker und gegebenenfalls bestimmter Zucker überhaupt in Frage kommt. Weiter ist das Problem an

Hand von Modellversuchen zu klären, da in der lebenden Pflanze ständig die verschiedensten Faktoren interferieren und eine saubere Faktorentrennung nicht so leicht möglich ist. Das zeigen im vorliegenden Fall die sich widersprechenden Befunde über die Bedeutung der Zucker.

Nun konnte bereits LIDFORS (1907) in vitro an Hühnereiweiß Frostfällungen beobachten, die bei Zusatz von Zuckern unterblieben. Später stellten NEWTON und BROWN (1926, 1931), FUCHS (1935) und MUDRA (1933) eine Schutzwirkung von Zuckern bei Preßsäften fest. KESSLER (1935) gelang jedoch die Wiederholung eines Teiles dieser Versuche nicht und er schließt mit Recht, daß die bearbeiteten Preßsäfte bereits denaturierte Proteine enthielten. (Nach unseren Erfahrungen mußte bei der Preßsaftgewinnung Säuredenaturierung der Proteine stattfinden.) SCARTH (1944) gibt zusammenfassend an, daß Zucker oder andere protektive Substanzen die Koagulation des Plasmas zu einem wesentlichen Betrage nicht zu hindern imstande wären. Es war also zu klären, ob und vor allen Dingen auch inwieweit eine Schutzwirkung von in der Zelle vorhandenen Stoffen auf Plasmaeiweiße in vitro tatsächlich festzustellen ist.

ULLRICH und HEBER (1957) konnten in einer kurzen Mitteilung zeigen, daß Plasmaeiweiße in wesentlichem Maße durch in der Zelle vorhandene Stoffe stabilisiert werden. Diese Schutzwirkung ging dem Zuckergehalt parallel, so daß anzunehmen ist, daß Zucker für den beobachteten Effekt veratwortlich waren. Betreffs ausführlicherer Versuchsergebnisse sei auf die Dissertation von HEBER (1958a) verwiesen. Es erhob sich nunmehr die Frage, ob Zucker allgemein oder nur einzelne Zucker für die beobachtete Frostschutzwirkung verantwortlich sind. Sie läßt sich nur beantworten, wenn man die Plasmaeiweiße von den übrigen Zellbestandteilen separieren kann und dann die Wirkung von Zusätzen definierter Stoffe auf das Verhalten gegen Frost prüft.

Eine Separierung der Plasmaeiweiße ließ sich durch Dialyse gegen Puffer erreichen, wobei alle niedermolekularen Stoffe entfernt wurden. Zu den resultierenden, relativ reinen Eiweißlösungen wurden verschiedene Zucker zugesetzt und deren schützende Wirkung im Gefrierversuch geprüft. Dabei ergab sich, daß die Schutzwirkung mit zunehmender Molekulargröße abnimmt. Es erhebt sich hier die Frage nach dem Mechanismus der Schutzwirkung der Zucker. Dazu haben sich mehrere Autoren recht widersprechend geäußert. MAXIMOV (1912) nahm eine unspezifische physikalische (osmotische) Wirkung der Zucker an. MUDRA (1933) betrachtet das „Entquellungsvermögen" der Zucker auf Plasmaeiweiße als wichtigen Faktor bei Erwerb der Frostresistenz, während FUCHS (1933, 1935a) einer bei Zuckerzunahme erhöhten Quellung des Plasmas Bedeutung beimißt. LEVITT (1956) meint dazu, daß Zucker nur in der Vacuole lokalisiert seien.

Nun können aus der abweichenden Wirkung verschiedener Zucker Rückschlüsse auf den Mechanismus der Zuckerschutzwirkung gezogen werden. Wenn man nämlich nicht gleiche Mengen, sondern gleiche Molaritäten verschiedener Zucker auf ihre Frostschutzwirkung hin betrachtet, so stellt sich heraus, daß etwa 1 Molekül Fructose durch 1 Molekül Saccharose oder Raffinose in der Frostschutzwirkung zu ersetzen ist.

Ullrich und Heber (1958) haben die hier herrschenden Verhältnisse einer näheren Analyse unterzogen und sind zu dem Schluß gekommen, daß die Zucker im in-vitro-Versuch im wesentlichen über einen molekularen Mechanismus wirken. Als Arbeitshypothese wurde angenommen, daß sie bei der durch den Frost erfolgenden Dehydratation der Eiweiße vertretungsweise Wasserstoffbrückenbindungen zu gegen Wasserentzug empfindlichen Zentren oder reaktiven Gruppen der Eiweiße ausbilden können. Dadurch sollte eine „Demaskierung" dieser Gruppen verhindert werden. Im Verfolge einer „Demaskierung" sollten bei Zuckermangel — so wurde angenommen — die reaktiven Gruppen unter Vernetzung und Denaturierung der Eiweiße miteinander reagieren. Diese Vorstellung wurde gewonnen an Hand von Gefrierversuchen bei -20^0 C. In der Pflanze liegen insofern andere Verhältnisse vor, als hier je nach der Temperatur dem Plasma und der Vacuole verschieden fest gebundene Wasseranteile durch Ausfrieren in den Intercellularen entzogen werden. Mit dem Entzug von Wasser, das an Eiweiß gebunden ist, tritt Zucker nun je nach der Temperatur erst über lockerer gebundene Hydratanteile und bei weitergehendem Wasserentzug auch über fest gebundenes Wasser bzw. direkt über seine OH-Gruppen mit Eiweiß in Wechselwirkung. Je nach den Umständen wird also das frostempfindliche Eiweiß an lockerer oder fester gebundenen Hydratanteilen des Zuckers partizipieren oder in unmittelbarer Wechselwirkung mit Zucker stehen. Insofern dürfte hier in weniger ausgeprägter Weise ein definierter molekularer Mechanismus der Schutzwirkung vorliegen als beim in-vitro-Versuch mit seinen klareren Bedingungen. Bei Temperaturen relativ nahe am Nullpunkt, bei denen die Zuckermoleküle von einer „Hydratsphäre" umgeben sind, ist ein molekularer Mechanismus der Schutzwirkung nicht anzunehmen, wohl aber bei niederen Temperaturen, bei denen nur Solvatwasser am Zucker verbleibt, das mit einer größeren Energie als etwa 1,4 kcal/Mol — dem Energiebetrag, der beim Übergang von Wasser in den Eiszustand frei wird — gebunden ist (vgl. Ullrich und Heber 1958). Es finden hier also alle Übergänge von einer unspezifischen Schutzwirkung der Zucker bis zu einer direkten Wechselwirkung statt.

Die Frage einer Schutzwirkung von Substanzen auf Plasmaeiweiße ist bisher stets aus ganz anderer Sicht diskutiert worden. Die osmotische

Theorie der Frostschutzwirkung osmotisch wirksamer Substanzen (MAXIMOV 1912, ÅKERMAN 1927, ANDERSSON 1944), zu denen natürlich die Zucker, aber auch alle anderen niedermolekularen, in der Zelle vorhandenen Substanzen zählen, fordert, daß eine Schutzwirkung nur über die Gefrierpunktserniedrigung zustande kommt. Bei hoher Konzentration an osmotisch wirksamer Substanz soll einmal die direkte Gefrierpunktserniedrigung eine Rolle spielen, vor allem aber soll die Menge des gefrorenen Wassers bei Temperaturen, die unter der Gefrierpunktserniedrigung liegen, ganz wesentlich von der Konzentration an osmotisch wirksamer Substanz abhängen. ÅKERMAN (1927) veröffentlichte eine Tabelle, die den Prozentsatz des gefrorenen Wassers in Lösungen verschiedener Konzentration bei verschiedenen Temperaturen angibt. Diese Tabelle hat weiteren Eingang in die Literatur gefunden (Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. II, S. 585, 1956; LEVITT 1956, S. 115) und wird zur Begründung der Wirksamkeit einer hohen osmotischen Substanzkonzentration bei der Frostresistenz der Pflanzen herangezogen. Als Berechnungsgrundlage diente offenbar das Gesetz für die Gefrierpunktserniedrigung $\triangle t = E \cdot c$ (c = Konzentration an gelöstem Stoff, E = molare Gefrierpunktserniedrigung des Lösungsmittels, $\triangle t$ = beobachtete Gefrierpunktserniedrigung), obwohl es strengere Gültigkeit nur für verdünnte Lösungen besitzt. Aber selbst wenn es statthaft wäre, eine Gültigkeit dieses Gesetzes vorauszusetzen, führt eine Durchrechnung zu anderen Ergebnissen. Die Fragestellung erfordert ja eine Betrachtung des ungefrorenen Wassers und nicht der Summe aus ungefrorenem Wasser und osmotisch wirksamer Substanz als Bezugsgröße, wie ÅKERMAN sie vornimmt, da ja nach der osmotischen Theorie nur das ungefrorene Wasser, nicht die osmotisch wirksame Substanz für eine Schutzwirkung in Frage kommt.

Tabelle 3. *Beziehung zwischen der Menge an Eis, die bei verschiedenen Gefriertemperaturen gebildet wird, und der ursprünglichen Lösung.* [ÅKERMAN (1927) nach LEVITT (1956)]

Temperatur °C	Konzentration der Lösung im Gleichgewicht mit Eis m	Prozent des gefrorenen Wassers in einer Lösung mit der ursprünglichen Konzentration			
		0,25 molar	0,5 molar	1,0 molar	2,0 molar
— 0,46	0,25	Spur			
— 0,93	0,5	50	Spur		
— 1,86	1,0	75	50	Spur	
— 3,72	2,0	87,5	75	50	Spur
— 7,44	4,0	93,8	87,5	75	50
—14,88	8,0	96,9	93,8	87,5	75

Tabelle 3 gibt die Åkermansche Tabelle wieder. Tabelle 4 die Werte, die erhalten wurden, wenn man Glucose als gelösten Stoff annimmt. Neben Stoffen niedrigeren Molekulargewichts enthält die Zelle auch

viele Stoffe von höherem Molekulargewicht als 180 (Glucose), so daß es erlaubt schien, gerade ein Monosaccharid als repräsentatives Beispiel für die niedermolekularen Bestandteile der Zelle auszuwählen. Für eine 8 m-Lösung wurde eine Berechnung im Gegensatz zu ÅKERMAN nicht durchgeführt, da es eine so hoch konzentrierte Glucoselösung nicht

Tabelle 4 *(Erklärung im Text)*

Temperatur °C	Konzentration der Lösung im Gleichgewicht mit Eis m	Prozent des gefrorenen Wassers am Gesamtwasser in einer Lösung mit der ursprünglichen Konzentration an Glucose			
		0,25 molar	0,5 molar	1,0 molar	2,0 molar
−0,46	0,25	Spur			
−0,93	0,5	52,5	Spur		
−1,86	1,0	78,5	55,0	Spur	
−3,72	2,0	91,5	82,5	61,0	Spur
−7,44	4,0	98,0	96,0	91,5	78,0

Tabelle 5

Temperatur in °C	−0,46	−0,93	−1,86	−3,72	−7,44
Mol ungefrorenes Wasser/Mol Glucose etwa	210	100	45	20	4

gibt. (Übrigens liegt beim 2-Komponentensystem Glucose-Wasser der eutektische Punkt bei −5,1° C [BEHRENS 1956], so daß auch eine 4 m-Lösung nicht existiert, wenn auch in der Zelle kristallisationshemmende Wirkungen von Lösungsgenossen eine Rolle spielen dürften.) Aus Tabelle 4 ist zu ersehen, daß ein beträchtlich größerer Anteil des Wassers bei den entsprechenden Temperaturen zum Ausfrieren kommt, als aus Tabelle 3 hervorzugehen scheint. Aber auch aus den Werten der Tabelle 4 ergeben sich anscheinend beträchtliche Anteile an ungefrorenem Wasser, wenigstens für eine 2 m-Glucoselösung bei −7,44° C. Errechnet man jedoch weiter aus den angegebenen Werten (Tabelle 4) die Anzahl der Moleküle ungefrorenen Wassers pro Molekül Zucker, wie das in Tabelle 5 durchgeführt worden ist, so ergibt sich ganz eindeutig, daß auch auf diesem Wege auf eine molekulare Zuckerschutzwirkung zu schließen ist, wenigstens bei Temperaturen unterhalb von etwa −7° C. Frostharte Pflanzen vermögen aber Temperaturen zum Teil weit unterhalb −30° C lebend zu ertragen! Bei −7,44° C stehen nämlich nach der Rechnung pro Zuckermolekül überhaupt nur 4 Moleküle Wasser zur Verfügung, so daß nicht einmal alle Gruppen des Zuckermoleküls, die Wasserstoffbrückenbindungen eingehen, mit einem Molekül Wasser besetzt sind. Dabei ist gleichgültig, von welcher Zuckerkonzentration beim Gefrieren ausgegangen wird. Das Zuckermolekül muß also bei

der Schutzwirkung entweder unter Vermittlung eines (brückenpfeilerartig wirkenden) Wassermoleküls oder unmittelbar, auf jeden Fall als eine Einheit wirken. Eine solche molekulare Schutzwirkung kann natürlich nur zustande kommen, wenn eine unmittelbare Wechselwirkung zwischen Zucker und Protein möglich ist, d. h. wenn der Zucker nicht in der Vacuole lokalisiert ist, wie LEVITT (1956, S. 111) sagt, sondern auch im Plasma.

Tatsächlich konnte an anderer Stelle gezeigt werden, daß niedermolekulare Zucker z. B. von den besonders frostempfindlichen Chloroplasten geradezu gespeichert werden (HEBER 1957). Chloroplasten sind aber Bestandteile des Plasmas, und die Zuckeranhäufung in ihnen fand vor allem in der Dormanzzeit statt, in der die Pflanze normalerweise auch frostresistent ist (KESSLER und RUHLAND 1938).

Es wurde oben bereits betont, daß das Gesetz für die Gefrierpunktserniedrigung nur für verdünnte Lösungen gilt. Über das Wasserbindungsvermögen konzentrierter Lösungen sind auf Grund der Theorie keine genauen Aussagen möglich, da diese nur ideale Verhältnisse berücksichtigt. Es liegen jedoch experimentelle Ergebnisse vor, die mittels der kryoskopischen Methode gewonnen wurden. Diese Methode muß vor allem bei Anwendung auf hochkonzentrierte Lösungen aus theoretischen Gründen beträchtlich zu hohe Werte liefern (vgl. HEBER 1958 a). Trotzdem läßt sich auch hier noch eine molekulare Wechselwirkung ableiten: Nach WEISMANN (1938) enthält 1 g Rohrzucker bei — 20° C 0,45 g gebundenes Wasser. Dieser *zu hohe* Wert entspricht einem Molverhältnis 1:8, womit gerade alle freien OH-Gruppen des Zuckermoleküls über eine Wasserstoffbrückenbindung mit einem Molekül Wasser verbunden sein könnten. Eine Schutzwirkung käme auch dann durch eine Wechselbeziehung Zucker-Protein über die Brücke eines Wassermoleküls zustande, ohne daß die Existenz einer „Hydratsphäre" als Voraussetzung für eine Schutzwirkung angenommen werden muß.

Im übrigen sei betont, daß die oben näher ausgeführten Angaben über die Wechselwirkung der Zucker mit den zu schützenden Proteinen natürlicherweise grob schematischen Charakter tragen müssen.

2. Zuckergehalt der Blätter und ihre Frostresistenz. Die an den freien Zuckern der Zelle vorgenommenen Untersuchungen führten zu dem Ergebnis, daß eine Parallelität des Zuckergehaltes mit dem Resistenzverlauf nur ganz bedingt festzustellen ist. Vor allem fand auch nach dem Absinken der Frostresistenz eine ganz wesentliche Erhöhung des Zuckergehaltes statt. Außerdem zeigte ein und dieselbe Weizensorte unter verschiedenen Versuchsbedingungen ein ganz verschiedenes Verhalten: Im Gewächshausversuch „kalt" ging die Frostresistenz im Jahre 1957 parallel mit dem Zuckergehalt, während der Feldversuch

des gleichen Jahres eine Parallelität weitgehend vermissen ließ, zumal anfänglich auch bei weit höherer Resistenz ein geringerer Zuckergehalt gefunden wurde als im Gewächshausversuch. Diese Ergebnisse stimmen wenig mit den Beobachtungen einiger anderer Autoren bei Wintergetreide überein (Åkerman 1927, Gassner und Grimme 1913 u. a.), doch konnten auch Tumanov (1931) und Constantinescu (1934) Abweichungen von einem parallelen Verlauf zwischen Frostresistenz und Zuckergehalt feststellen. Bei anderen Pflanzen sind dagegen Abweichungen im Verlauf von Resistenz und Zuckergehalt sehr oft anzutreffen (Kessler 1935, Pisek 1950, Larcher 1954 u. a.).

Weiter wurde gefunden, daß der Gehalt an Glucose und Fructose eine weit bessere Übereinstimmung mit dem Grade der Frostresistenz aufweist als der Gesamtzuckergehalt. Dieser Befund steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Kneen und Blish (1941), die eine Beziehung zum Disaccharidgehalt herleiteten (vgl. jedoch Constantinescu 1934). Die osmotische Theorie verlangt nun, daß Monosaccharide pro Gewichtsanteil eine größere Wirkung besitzen als höhere Zucker, und insofern könnte unser Befund zur Stützung dieser Theorie beitragen. Wesentliche Gründe berechtigen aber zu der Annahme, daß die Verhältnisse anders liegen. Trotz der guten Parallelität des Resistenzverlaufes mit dem Monosaccharidgehalt zeigt nämlich der Vergleich von Feldversuch (Abb. 8 und 9) und Kaltgewächshausversuch (Abb. 10 und 11) eine doppelt so hohe Resistenz im Feldversuch (Abb. 6) bei in beiden Fällen etwa gleichem Gehalt an Monosacchariden. Das zeigt, daß auch der absolute Gehalt an Monosacchariden pro Zelle nicht entscheidend ist für den Grad der Frostresistenz, sondern daß vielmehr in einem Fall dieselbe Menge Zucker in stärkerem Maße wirken kann als in einem anderen Falle, was gleich noch zu erörtern sein wird. Vor allem aber weisen die Versuche mit Plasmaeiweißlösungen in eine ganz andere Richtung. Sie vermögen nämlich eine Erklärung der teilweise besseren Übereinstimmung des Monosaccharidgehaltes mit der Frostresistenz gegenüber der des Gesamtzuckergehaltes insofern zu liefern, als es sich zeigte, daß bei den Zuckern nicht das Gewicht, sondern die Anzahl der vorhandenen Moleküle den Grad der Schutzwirkung auf Plasmaeiweiße bestimmt, also z. B. die Gewichtseinheit Monosaccharid eine etwa dreifach höhere Schutzwirkung zu entfalten vermag als dieselbe Menge Trisaccharid. Am Gesamtzuckergehalt haben nun Saccharose, Raffinose, Tri-, Tetra- und Pentasaccharid zusammen einen ganz wesentlichen Anteil (Abb. 8—12). Sie wirken aber als Frostschutzagentien erheblich weniger als ihrem Gewichtsanteil entspricht.

Auf Grund dieser Befunde werden jetzt auch Angaben in der Literatur verständlicher, wonach eine Übereinstimmung zwischen Zuckergehalt und Frostresistenz nur unvollständig ist (Harvey 1918, Kessler 1935,

Pisek 1953 u. a.), wenn auch nicht gesagt werden soll, daß damit alle von einer Parallelität zwischen Frostresistenz und Zuckergehalt abweichenden Beobachtungen erklärt werden können. In den bisherigen Untersuchungen wurden ja ganz allgemein nur Gesamtzuckergehalte oder reduzierende und nicht-reduzierende Zucker angegeben.

Die Versuche mit Plasmaeiweiß ließen weiter erkennen, daß Eiweiße in Blattextrakten etwa proportional ihrem Zuckergehalt gegen Frost geschützt werden. Dagegen können die intakten Blätter, aus denen ja die Blattextrakte erst hergestellt wurden, bisweilen ein Resistenzverhalten zeigen, welches nicht ihrem Zuckergehalt entspricht (Abb 15). Das weist ganz klar darauf hin, daß die Zucker im Blatt unter Umständen irgendwie in ihrer Frostschutzwirkung behindert sein können, d. h. daß wir zwischen „aktivem" und „inaktivem" Zucker unterscheiden müssen. Der Gedanke liegt nahe, daß die Verteilung der Zucker innerhalb der Zelle eine Rolle spielt.

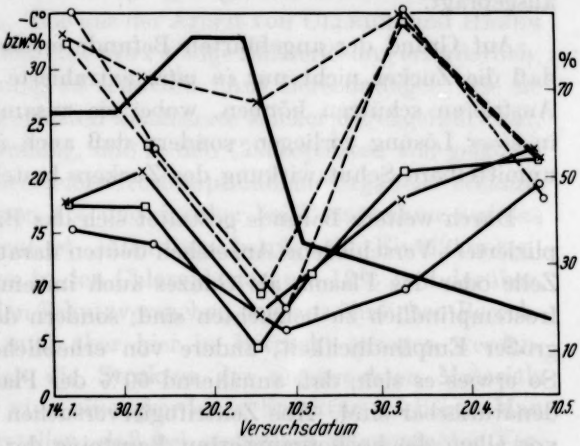


Abb. 15. Die Abhängigkeit der Frostfällung von kochstabilen Eiweißen aus Blattextrakten vom Zuckergehalt der Blätter und ihre Relation zur Frostresistenz der Blätter. Ordinate links: Gesamtzucker in Prozent des Trockengewichts der Blätter, Frostresistenz der Blätter in °C. Ordinate rechts: Prozentualer Anteil der kochstabilen Eiweißfraktion, der durch Ausfrieren des zucker- und eiweißhaltigen Blattextraktes nicht ausgefällt wurde. Abszisse: Zeiten der Probeentnahme. ——— Frostresistenz; ——— Gesamtzucker; — — — froststabilisierter Anteil der Eiweißfraktion; × Criewener 192; □ Hauter's II; ○ Carsten V (z. T. aus Ullrich und Heber 1957)

Dies ist erstaunlicherweise noch nicht konsequent verfolgt worden, obwohl Levitt (1954) und Jeremias (1956) den Ansatz machen, an Eiweiß gebundenen Zucker sozusagen als plasmaeigen zu betrachten, während freier Zucker in der Vacuole lokalisiert sein soll. Levitt findet im Gegensatz zu Jeremias keine Korrelation zwischen an Eiweiß gebundenen Zuckern und dem Resistenzgrad.

Es besteht aber überhaupt kein Grund anzunehmen, daß der Zucker, der im Plasma vorhanden ist, an Eiweiß chemisch gebunden sein soll. Tatsächlich ließ sich zeigen, daß Chloroplasten, also geformte Bestandteile des Plasmas, einen ganz wesentlich höheren Gehalt an niedermolekularen, frei vorliegenden Zuckern haben können als die Vacuole (Heber 1957). Ein erhöhter Zuckergehalt ist vor allem in der Dormanzzeit festzustellen. Daraus geht hervor, daß der vorhandene Zucker

keinesfalls nur in der Vacuole lokalisiert sein muß, weiter aber, daß von einer Gleichverteilung des Zuckers innerhalb von Plasma und Vacuole auch nicht die Rede sein kann. Das Plasma oder aber Teile des Plasmas besitzen ganz offenbar ein elektives Speichervermögen für Zucker, wie das beispielsweise für anorganische Ionen schon festgestellt worden ist. Diese Speicherfunktion ist je nach dem physiologischen Zustand des Organismus verschieden stark ausgeprägt.

Auf Grund der angeführten Befunde erscheint es daher als sicher, daß die Zucker nicht nur *in vitro* extrahierte Blatteiweiße gegen das Ausfrieren schützen können, wobei sie zusammen mit den Eiweißen in *einer* Lösung vorliegen, sondern daß auch *in vivo* eine direkte und unmittelbare Schutzwirkung des Zuckers bestehen kann.

Durch weitere Befunde gestaltet sich das Bild allerdings noch komplizierter: Verschiedene Anzeichen deuten darauf hin, daß gar nicht die Zelle oder das Plasma als Ganzes auch im empfindlichen Zustand als frostempfindlich zu betrachten sind, sondern daß einzelne Bezirke von großer Empfindlichkeit, andere von erheblicher Resistenz existieren. So erwies es sich, daß annähernd 60% der Plasmaeiweiße durch Frost denaturierbar sind. Aus Zentrifugierversuchen wurde geschlossen, daß vor allem die hochorganisierten Bausteine der Zellen frostempfindlich sind. Weiter zeigten Studien des Gaswechsels, daß das Assimilationssystem erheblich leichter durch Frost tangierbar ist als das Dissimilationssystem. Beobachtungen an Pflanzen, die starker Frostwirkung ausgesetzt waren, ergaben, daß offenbar nach dem Gefrieren ein kontrollierter Eiweißabbau einsetzte, was so zu verstehen ist, daß empfindliche Eiweiße durch Frostwirkung denaturierten, wobei kein Zelltod eintrat, und ihre Bestandteile durch Abbau wieder in den Stoffwechsel einbezogen werden. Alle diese Befunde sollen an anderer Stelle näher erörtert werden. Es geht jedoch daraus hervor, daß die Schutzstoffe der Zelle auch innerhalb des Plasmas Orte besonderer Schutzbedürftigkeit besser zu schützen haben als andere Bereiche des Plasmas, die weniger der Frostwirkung ausgesetzt sind. Möglicherweise erstreckt sich das Verteilungsproblem der Zucker nicht nur auf eine Verteilung zwischen Plasma und Vacuole, sondern weitergehend auch auf eine Verteilung innerhalb des Plasmas.

Auch diese Ergebnisse sind geeignet, Licht auf die Beobachtung zu werfen, daß oft bei prinzipiell vorhandener Übereinstimmung von Zuckergehalt und Frostresistenz im einzelnen nicht zu vernachlässigende Abweichungen auftreten. Es kommt ja nur auf den Zuckergehalt des Plasmas bzw. seiner empfindlichen Orte an, während alle Analysendaten Zuckergehalte der Gesamtzelle wiedergeben. Weiter ist wichtig, welche

Zucker vorhanden sind. Höher molekulare Zucker werden weniger schutzwirksam sein als niedermolekulare.

Es ist noch auf die Frage einzugehen, ob die an Hand von Modellversuchen erarbeiteten Vorstellungen über eine Schutzwirkung der Zucker gegenüber isolierten Eiweißen auch in quantitativer Beziehung auf die Pflanze übertragen werden können, ob die im Plasma vorhandene Konzentration der Zucker überhaupt genügt, um einen sehr wesentlichen Schutz zu bewirken. Wie aus der Arbeit von Ullrich und Heber (1958) hervorgeht, ist in vitro eine etwa 4%ige Zuckerlösung erforderlich, um eine 2%ige Eiweißlösung zu schützen. Aus Berechnungen, wie sie Heber (1957) für in Chloroplasten lokalisierte Zucker durchgeführt hat, folgt rein größenordnungsmäßig, daß in den Chloroplasten von gehärteten Pflanzen, die wir als besonders frostempfindliche Organelle erkannt haben, ein Zuckergehalt von 4% und darüber bei Bezugnahme auf das Frischgewicht völlig normal ist. Allerdings beträgt die Eiweißkonzentration gehärteter Pflanzen in den Chloroplasten um 12% und darüber, ist also weit höher als in den Schutzversuchen, wie aus ähnlichen Berechnungen hervorgeht. Es muß aber hier in Betracht gezogen werden, daß beim in-vitro-Versuch die Struktur des untersuchten Materials zerstört ist, während in vivo eine geordnete Struktur vorliegt. Man kann sich nun leicht vorstellen, daß bei statistisch ungeordneter Verteilung empfindlicher Proteinpartikel in Lösung eine höhere Zuckerkonzentration zur Erzielung derselben Schutzwirkung notwendig ist, als wenn die empfindlichen Proteine in gesetzmäßiger Struktur, z. B. in lamellarem Aufbau vorliegen.

Abschließend ist zu sagen, daß ganz offenbar die niedermolekularen Zucker der Zelle eine wesentliche Bedeutung für deren Frostresistenz besitzen, sofern sie nicht in der Vacuole, sondern im Plasma lokalisiert sind. Dem Zuckergehalt der Vacuole dürfte geringere Bedeutung beizumessen sein.

Zusammenfassung

1. Der Zuckergehalt von Weizenblättern steigt vom Härtungsbeginn an sprungartig an. Eine Übereinstimmung von Zuckergehalt und Frostresistenzverhalten ist jedoch keineswegs immer gegeben. Vor allem wiesen unter Feldbedingungen wachsende Pflanzen des gleichen Materials bei höherer Resistenz einen geringeren Zuckergehalt auf als der künstlichen Härtung im Gewächshaus unterworfene Pflanzen. Der Zuckerspiegel wurde im einzelnen verfolgt, wobei sich ergab, daß der Gehalt an Monosacchariden weit besser als der Gesamtzuckergehalt mit dem Resistenzgrad übereinstimmte. Die Abweichungen von einer Parallelität zwischen beiden Größen werden dabei aber nur reduziert, sie verschwinden nicht.

2. Aus Gefrierversuchen mit Plasmaeiweißlösungen ging hervor, daß die Schutzwirkung der Zucker deren Molekulargewicht umgekehrt proportional ist. Dieser Befund dürfte teilweise die beobachtete Proportionalität der Frostresistenz mit dem Monosaccharidgehalt erklären.

3. Weiter ist offenbar die Verteilung der Zucker innerhalb der Zelle für ihre Frostresistenz entscheidend. Dies ist unter anderem daraus zu schließen, daß Eiweiße von Blattextrakten entsprechend dem Zuckergehalt der Blätter im Gefrierversuch gegen Denaturierung geschützt wurden, während die Frostresistenz derselben Blätter nicht mit dem Gang des Zuckergehaltes übereinstimmte.

4. Es werden Betrachtungen über den Mechanismus der Schutzwirkung der Zucker angestellt. Diese dürften je nach den Gefrierbedingungen über Wassermoleküle oder direkt mit den frostempfindlichen Proteinen in Wechselwirkung treten und so eine Denaturierung verhindern, die sonst als Folge des Wasserentzuges durch die Eisbildung eintritt.

Herrn Prof. Dr. H. Ullrich danke ich für die Förderung und Unterstützung der Arbeit, Herrn Dr. W. Franke für wertvolle Ratschläge. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft gebührt Dank für apparative und finanzielle Unterstützung, Fräulein v. Fricken für ihre zuverlässige Hilfe bei einem Teil der Untersuchungen.

Literatur

Åkerman, A.: Studien über den Kältetod und die Kälteresistenz der Pflanzen. Lund 1927. — Andersson, G.: Gas change and frost hardening studies in winter cereals. Lund 1944. — Behrens, M.: Gefriertrocknung. In A. M. Rauen, Biochemisches Taschenbuch, S. 1099. 1956. — Charles, J.: Les glucides du blé. C. R. Acad. Sci. (Paris) **241**, 1329 (1955). — Constantinescu, E.: Weitere Beiträge zur Physiologie der Kälteresistenz. Planta (Berl.) **21**, 304—323 (1934). — Dedonder, R.: Glucides et composés voisins. Bull. Soc. chim. Fr. **34**, 874 (1952). — Dexter, S. T.: Salt concentration and reversibility of ice formation as related to the hardiness of winter wheat. Plant Physiol. **9**, 601—610 (1934). — Growth, organic nitrogen fractions and buffer capacity in relation to hardiness of plants. Plant Physiol. **10**, 149—158 (1935). — Fuchs, W. H.: Zur Analyse des physiologischen Zustandes der Pflanzen im Zusammenhang mit Temperatureinflüssen. Kühn-Arch. **38**, 232—286 (1933). — Der Anteil des Zuckers am osmotischen Wert bei Weizen. Planta (Berl.) **23**, 340—348 (1935a). — Die Veränderungen der Struktur und die Reaktion der Zelle bei Abkühlung. Kühn-Arch. **39**, 1—40 (1935b). — Gassner, G., u. C. Grimme: Beiträge zur Frage der Frosthärte der Getreidepflanzen. Ber. dtsch. bot. Ges. **31**, 507—516 (1913). — Harvey, R. B.: Hardening process in plants and development from frost injury. J. agric. Res. **15**, 83—111 (1918). — Heber, U.: Zur Frage der Lokalisation von löslichen Zuckern in der Pflanzenzelle. Ber. dtsch. bot. Ges. **70**, 371—382 (1957). — Stoffliche Veränderungen in der Weizenpflanze beim Erwerb der Frostresistenz im Zusammenhang mit deren Ursachen. Diss. Bonn 1958a. — Über eine neue Methode zur quantitativen Stoffbestimmung am Chromatogramm, insbesondere zur Analyse von Zucker- und Aminosäuregemischen. Z. analyt. Chem. **161**, 409—421 (1958b). — Hellström, N.: Investi-

gations on oil turnips and oil rape. III. A survey of starch content in connection with hardening. Acta agric. scand. **5**, 23—30 (1954). — Iljin, W. S.: Über den Kältetod der Pflanzen und seine Ursachen. Protoplasma **20**, 105—124 (1933). — Die Veränderung des Turgors der Pflanzenzellen als Ursache ihres Todes. Protoplasma **22**, 299—311 (1934). — The relation of cellsap concentration to cold resistance of plants. Bull. Ass. russe pour rech, sci. Prague **3**, (VIII), 33—55 (1935) Jeremias, K.: Zur Physiologie der Frosthärtung unter besonderer Berücksichtigung von Winterweizen. Planta (Berl.) **47**, 81—104 (1956). — Kessler, W.: Über die inneren Ursachen der Kälteresistenz der Pflanzen. Planta (Berl.) **24**, 312—352 (1935). — Kessler, W., u. W. Ruhland: Weitere Untersuchungen über die inneren Ursachen der Kälteresistenz. Planta (Berl.) **28**, 159—204 (1938). — Kneen, E., u. M. J. Blish: Carbohydrate metabolism and winter hardiness of wheat. J. agric. Res. **62**, 1—26 (1941). — Larcher, W.: Die Kälteresistenz mediterraner Immergrüner und ihre Beeinflußbarkeit. Planta (Berl.) **44**, 607—635 (1954). — Levitt, J.: Frost, drought and heat resistance. Ann. Rev. Plant Physiol. **2**, 245—268 (1952). — Investigations on the cytoplasmic particulates and proteins of potato tubers. II. Nitrogen and phosphorus and carbohydrate contents. Physiol. Plantarum (Cph.) **7**, 117—123 (1954). — The hardiness of plants. New York 1956. — Lidforss, B.: Die wintergrüne Flora. Lund 1907. — Maximov, N. A.: Chemische Schutzmittel der Pflanze gegen Erfrieren. Ber. dtsch. bot. Ges. **30**, 52—65, 293 bis 305, 504—516 (1912). — Morris, D. L.: Quantitative determination of carbohydrates with Dreywoods anthrone reagent. Science **107**, 254 (1948). — Mudra, A.: Zur Physiologie der Kälteresistenz des Winterweizens. Planta (Berl.) **18**, 435—478 (1933). — Müller-Thurgau, H.: Über Zuckeranhäufung in Pflanzenteilen infolge niedriger Temperatur. Landwirtsch. Jb. **11**, 751—828 (1882). — Über das Gefrieren und Erfrieren der Pflanzen. Landwirtsch. Jb. **15**, 453—610 (1886). — Newton, R., and W. R. Brown: Seasonal changes in the composition of winter wheat plants, in relation to frost resistance. J. agric. Sci. **16**, 522—538 (1926). — Frost precipitation of plant juice. Canad. J. Res. **5**, 87—110 (1931). — Partridge, S. M.: Aniline hydrogen phtalate as a straying reagent for chromatography of sugars. Nature (Lond.) **164**, 443 (1949). — Partridge, S. M., and R. G. Westall: Filter paper partition chromatography of sugars. Biochem. J. **42**, 238 bis 250 (1948). — Pisek, A.: Frosthärte und Zusammensetzung des Zellsaftes bei Rhododendron ferruginum, Pinus cembra und Picea excelsa. Protoplasma **39**, 129 bis 146 (1950). — Wie schützen sich die Alpenpflanzen gegen Frost? Umschau **21**, 641 (1953). — Przylecki, St. v., u. R. Majmin: Untersuchungen über die Bindung der Biokolloide. Biochem. Z. **240**, 98—122 (1931). — Rosa, J. T.: Pentosan content in relation to hardiness of vegetable plants. Proc. Amer. Soc. horticult. Sci. **17**, 207—210 (1920). — Sachs, J.: Krystallbildungen bei dem Gefrieren und Veränderungen der Zellhäute bei dem Auftauen saftiger Pflanzenteile, mitgeteilt von W. Hofmeister. Ber. Verh. kgl. sächs. Ges. Wiss. Leipzig, math.-phys. Kl. **12**, 1—50 (1860). Zit. nach Levitt 1956. — Scarth, G. W.: Cell physiological studies of frost resistance. New Physiologist **43**, 1—12 (1944). — Siminovitch, D., and D. R. Briggs: Studies on the chemistry of the living bark of the black locust tree. III. The validity of plasmolysis and desiccation tests for determining the frost hardiness of bark tissue. Plant Physiol. **28**, 15—34 (1953). — Studies on the chemistry of the living bark of the black lucost tree in relation to its frost hardiness. VII. A possible direct effect of starch on the susceptibility of plants to freezing injury. Plant Physiol. **29**, 331—337 (1954). — Stoll, A., u. E. Wiedemann: Chlorophyll. Fortschr. Chem. org. Naturstoffe **1**, 159 (1938). — Tumanov, I. I.: Das Abhärten winterannueller Pflanzen gegen niedrige Temperaturen. Phytopath. Z. **3**, 303—334 (1931). — Ullrich, H.: Biologische Kältewirkungen und plasmatische Frostresistenz. Protoplasma **38**, 165—183

(1943). — Ullrich, H., u. U. Heber: Über die Schutzwirkung der Zucker bei der Frostresistenz von Winterweizen. Planta (Berl.) **48**, 724—728 (1957). — Über das Denaturieren pflanzlicher Eiweiße durch Ausfrieren und seine Verhinderung. Planta **51**, 399—413 (1958). — Ullrich, H., u. J. Seemann: Über die Verwendung von handelsüblichen Kühlschränken für Frostresistenzversuche an Pflanzen. Z. Pflanzenzüchtg **25**, 1—7 (1943). — Ullrich, H., u. P. van Veen: Weitere Untersuchungen über das Ausfrieren von Kolloiden und Kolloidgemischen im Hinblick auf die plasmatische Frostresistenzforschung an Pflanzen. Kolloid-Z. **100**, 389 (1942). — Vassiljew, I. M.: Untersuchungen über die Dynamik der Kohlenhydrate beim Weizen. I. Einfluß der Wasserversorgung auf die Umwandlung der Kohlenhydrate. Wiss. Arch. Landwirtsch. A **7**, 126—146 (1931). — Weismann, O.: Eine theoretische und experimentelle Kritik der bound-water-Theorie. Protoplasma **31**, 27—68 (1938).

Dr. U. Heber,
Institut für Landwirtschaftliche Botanik der Universität Bonn
Meckenheimer Allee 176

Planta, Bd. 52, S. 173—186 (1958)

Aus der Biologischen Forschungsabteilung der Österreichische Stickstoffwerke Aktiengesellschaft, Linz a. d. Donau (Leiter: Priv.-Doz. Dr. H. Linser)

DER WUCHSSTOFFGEHALT VERSCHIEDENER BRASSICA-PFLANZEN IN ABHÄNGIGKEIT VON IHREM ENTWICKLUNGSZUSTAND

Von

H. Linser, O. Kiermayer und E. Youssef

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 31. Mai 1958)

I. Einleitung

Wie Linser (1939) zeigte, haben *Brassica*-Pflanzen einen sehr hohen Gehalt an zellstreckungsfördernden Wuchsstoffen. Diese Tatsache wurde durch das Auffinden von Indol-3-Essigsäure und Indol-3-Acetonitril in *Brassica*-Pflanzen bestätigt (Holley et al. 1951, Denffer et al. 1952a, Denffer et al. 1952b, Jones et al. 1952, Weller et al. 1954, Fischer 1954, Linser et al. 1954, Kefford 1955). Die Tatsache, daß in den *Brassica*-Pflanzen relativ große Mengen von Indolderivaten vorliegen, von welchen einige als Zellstreckungswuchsstoffe wirksam sind, legt die Vermutung nahe, daß diese Pflanzen-Gruppe hinsichtlich des Stoffwechsels der Indolkörper einen Sonderfall darstellt und daß die relativ großen Mengen an Indolkörpern vielleicht nicht alle als Produkte des Hormongehaltes gelten dürfen, sondern zum Teil wenigstens als Nebenprodukte eines von der Norm abweichenden Tryptophanstoffwechsels angehäuft werden. Obzwar nämlich die Brassicaceen außerordentlich hohe Wuchsstoffmengen enthalten, zeigen ihre Keimpflänzchen dennoch von außen her zugefügten Wuchsstoffmengen gegenüber keine geringere Empfindlichkeit, als sie bei wuchsstoffärmeren Pflanzen auch vorliegt (Linser 1954). Man darf daher die Möglichkeit nicht abweisen, daß in den *Brassica*-Pflanzen hohe Wuchsstoffmengen in einer Weise abgelagert, adsorbiert oder auch chemisch gebunden vorliegen, so daß sie dem eigentlichen Hormonhaushalt der Pflanze (wenigstens vorübergehend) entzogen sind und daß diese Mengen erst durch den Eingriff unserer Extraktionsmethoden in Freiheit bzw. in wirksame Form überführt werden. Wenn dies der Fall sein sollte, so müssen doch auch diese „gebundenen" oder durch Adsorption an besonderen Orten inaktivierten Wuchsstoffmengen irgendwie mit dem Hormonspiegel der Pflanze in Zusammenhang stehen, indem sie entweder aus ihm abgezweigt wurden oder für ihn als Reserve-Pool dienen können. Leider besitzen wir noch keine Methode, welche eine quantitative Bestimmung der Wuchsstoffe

ohne Extraktion aussichtsreich erscheinen läßt. Zweifellos aber ist es nicht nur von Interesse, den Gehalt der Pflanze an jeweils unmittelbar wirksamen Wuchsstoffen kennenzulernen, sondern ebenso seinen Gesamtumsatz im Verlauf der Entwicklung der Pflanze näher zu studieren. Daneben schien uns auch die Verteilung des Wuchsstoffes in den verschiedenen Pflanzenorganen (wie Wurzel, Stengel und Blätter) von besonderem Interesse.

II. Material und Methodik

Als Pflanzenmaterial dienten 4 Varietäten der Art *Brassica oleracea*, und zwar *B. oleracea var. sabauda* (Wirsingkohl), *B. oleracea var. gemmifera* (Sprossenkohl), *B. oleracea var. botrytis* (Blumenkohl) und *B. napus* (Raps). Die Pflanzen wurden im Freiland in Mistbeeterde gezogen, je nach ihrer Größe abgeerntet[1] und als Stadium III (kleine Keimlinge), Stadium IV—VI (größere Jungpflanzen) und Stadium VII (erwachsene, blühende Pflanzen) bezeichnet. In Tabelle 1 ist das Alter und das jeweilige Gewicht der untersuchten *Brassica*-Pflanzen wiedergegeben. Die Auswahl der Stadien konnte wegen der unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeiten der verwendeten Pflanzensorten nicht nach dem Alter erfolgen, woraus sich die uneinheitlichen Altersangaben in der Tabelle erklären.

Tabelle. *Alter und Gewicht (in Klammern) der Brassica-Pflanzen, aus welchen die Extrakte hergestellt wurden (in Tagen, Gewicht in Gramm)*

Pflanzensorte:	Stadien der Entwicklung			
	I (trockene Samen)	II (angekeimte Samen)	III-VI (Jungpflanzen)	VII (vollentwickelte Pflanzen)
Sprossenkohl . . .	—	5	von 26 bis 42 (von 0,7—7,0)	136 (ca. 1000)
Wirsingkohl . . .	—	5	von 36 bis 100 (von 0,7—26)	163 (ca. 1200)
Riesenblumenkohl	—	5	von 37 bis 100 (von 0,7—42)	154 (ca. 1100)
Sommerraps . . .	—	5	von 26 bis 41 (von 0,8—2)	92 (ca. 70)

Die trockenen Samen wurden als Stadium I, die in großen Petrischalen in Aqua dest. 5 Tage lang gequollenen Samen als Stadium II bezeichnet. Die Versuche wurden in den Monaten von März bis September durchgeführt.

[1] Von allen verwendeten Pflanzen eines jeden Stadiums wurden vor der Extraktion photographische Abbildungen mit einem Vergleichsmaßstab hergestellt und außerdem von jeder Pflanze das Frischgewicht bestimmt.

Zur Bestimmung des Gesamtwuchsstoffgehaltes der Pflanzen wurde die Alkohol-Wasser-Extraktionsmethode in Verbindung mit der Papierchromatographie herangezogen. Die qualitative Auswertung der Chromatogramme erfolgte colorimetrisch mit Hilfe der Eisenchlorid-Perchlorsäure-Reaktion nach GORDON und WEBER (1951). Die quantitative Bestimmung der Wuchsstoffe wurde mit Hilfe des Pastentestes (LINSER 1938, 1939) durchgeführt.

Die Herstellung der Extrakte erfolgte in der gleichen Weise wie bereits früher beschrieben (LINSER et al. 1956), und zwar wurden bei Samen je 10 g, bei gequollenen Samen je 15 g und bei frischem Pflanzenmaterial je 20 g Frischgewicht mit der 5—7fachen Menge an Lösungsmittel (ein Gemisch aus 1 Teil 96%igem Alkohol, 1 Teil dest. Wasser und 0,1% $Al_2(SO_4)_3$ (bezogen auf die gesamte Flüssigkeitsmenge) heiß während 12 Std am Rückflußkühler extrahiert. Der erkaltete Extrakt wurde zentrifugiert, am Wasserbad eingeengt, bis kein Alkohol mehr vorhanden war, nochmals zentrifugiert und schließlich mit Äther ausgeschüttelt und zur Trockne abgedampft. Der Rückstand wurde sodann in 2 cm^3 Äther aufgenommen und mit Hilfe einer Mikrometer-Meßpipette auf das Chromatogrammpapier (Whatman I) 6mal so aufgetragen, daß jeder Spot 0,5 g des Frischgewichtes enthielt, insgesamt also 3 g des Frischgewichtes per Chromatogramm (für die Elution) aufgetragen waren. Als Lösungsmittel diente ein Gemisch von Propanol: H_2O: NH_3 (80:15:5) (VLITOS et al. 1953); es wurde durch 16 Std bei 22° C absteigend chromatographiert. Die vorherige Sättigungsdauer des Chromatogrammpapiers betrug 5 Std. Neben den 6 Spots, die nach der Trocknung des Chromatogrammpapiers mit dem gleichen Lösungsmittel eluiert wurden, sind auf jedem Chromatogramm noch weitere Spots, sowie reine synthetische Indol-3-Essigsäure als Vergleichssubstanz aufgetragen. Diese zusätzlichen Chromatogramme wurden mit dem Indolreagens (Eisenchlorid-Perchlorsäure) besprüht und die R_f-Werte bestimmt.

Die Eluate, die aus 10 gleichgroßen Chromatogrammabschnitten gewonnen wurden, wurden in 2 g Lanolin aufgenommen und im Pastentest an *Avena*-Koleoptilen getestet. Die Wirkung von 1 g Paste entsprach somit einer Wuchsstoffmenge, welche in 1,5 g Frischgewicht einer Pflanze enthalten war. Über die genaue Methodik der Extraktion, Chromatographie und Durchführung des physiologischen Testes vgl. LINSER und KIERMAYER (1957).

III. Die Versuche

Nachfolgend soll auf die Versuchsergebnisse mit Sprossenkohl, Wirsingkohl, Riesenblumenkohl und Sommerraps, die bei verschiedenen Entwicklungsstadien (I—VII) dieser Pflanzen erhalten wurden, näher eingegangen werden. Die Versuchsergebnisse der 4 verwendeten Pflanzen sind in Diagrammen wiedergegeben, bei welchen auf der Ordinate die Wuchsstoffwirksamkeit in Z% (prozentueller Längenzuwachs gegenüber Dem Zuwachs der Kontrollen im Pastentest) auf der Abszisse die R_f-Werte aufgetragen wurden. Die Spots, die nach dem Besprühen der Chromatogramme mit dem Indol-Reagens erschienen, wurden in den Diagrammen in Form von Kreisen, genau an dem entsprechenden R_f-Bereich eingezeichnet und außerdem der jeweilige Farbton mit einer Nummer angegeben. Der Standardfehler des Pastentestes (ca. $\pm 10\%$)

wurde durch eine waagrechte, gestrichelte Linie gekennzeichnet. Auf jedem Diagramm ist ferner der für synthetische Indol-3-Essigsäure (Vergleichssubstanz) erhaltene Spot bei seinem entsprechenden R_f-Wert in Form eines schwarzen Kreises eingezeichnet.

Stadium I (trockene Samen): Wie ein Vergleich der vier Diagramme auf Abb. 1A zeigt, war die größte Wuchsstoffwirksamkeit bei Riesenblumenkohl zu beobachten, während Sommerraps und Sprossenkohl keine signifikante Aktivität ergab. Aus Chromatogramm-Abschnitten mit kleineren R_f-Werten als Indol-3-Essigsäure (IES) konnte bei Riesenblumenkohl und Wirsingkohl eine mäßige Wuchsstoffwirksamkeit gefunden werden. Es scheint somit, daß die Samen von Riesenblumenkohl und Wirsingkohl *einen oder mehrere Wuchsstoffe mit kleineren R_f-Werten als IES enthalten.* Da jedoch in den aktiven Zonen keine Farbreaktion auftrat, war eine Identifizierung der wirksamen Substanzen nicht möglich.

Bei allen untersuchten Pflanzen mit Ausnahme von Sommerraps konnte ferner in den untersten Chromatogrammabschnitten (ab R_f 0,7) eine geringe Wuchsstoffwirksamkeit gefunden werden. Die schwache Hemmstoffwirkung, die gelegentlich beobachtet wurde, war nicht gesichert.

Auf den Samen-Chromatogrammen, die mit dem Indolreagens besprüht wurden, zeigten sich viele gefärbte Spots, die jedoch mit Ausnahme eines grünen Spots bei Riesenblumenkohl (R_f 0,71) keine Wuchsstoffwirkung ergaben. Unter diesen Spots erschien bei Sprossenkohl, Wirsingkohl und Sommerraps ein gelber Fleck mit annähernd gleichem R_f-Wert als IES.

Bei Sprossenkohl-Samen konnte ein roter Spot mit einem R_f-Wert von 0,23 (IES-Spot bei diesem Chromatogramm bei $R_f = 0{,}34$) gefunden werden. Auf Grund des R_f-Wertes und Farbtons, sowie der Wirkungslosigkeit im physiologischen Test dürfte es sich bei diesem Spot *um Indol-3-Carbonsäure* handeln. Diese Substanz konnte von Youssef und Kiermayer (1957) als photolytisches Abbauprodukt des Indol-3-Acetonitrils gefunden werden.

Stadium II (angekeimte Samen): Wie aus Abb. 1B ersichtlich, hat sich, mit Ausnahme von Sommerraps, die Wuchsstoffwirksamkeit bei 5 Tage in Wasser gequollenen Samen auf die *R_f-Bereiche von 0,6 bis 0,9* verlagert. Bei Sommerraps konnte keine Aktivität gefunden werden. Die meisten der in Stadium I vorhandenen gefärbten Spots verschwanden hier vollkommen, dafür trat bei allen Chromatogrammen ein Spot mit einem R_f-Wert zwischen 0,75—0,83 deutlich in Erscheinung. Bei Riesenblumenkohl und Wirsingkohl besaß dieser Spot eine violette Färbung und einen R_f-Wert von 0,80 bzw. 0,83. Die Wuchsstoffwirksamkeit, R_f-Wert und der Farbton dieses Spots waren in guter Übereinstimmung mit den Werten eines synthetischen *Indol-3-Acetonitrils (IAN).*

Stadium III—VI (Jungpflanzen bis ausgewachsene Pflanzen, jedoch ohne Blüten): Die Ergebnisse aus Stadium III, IV, V und VI erlauben

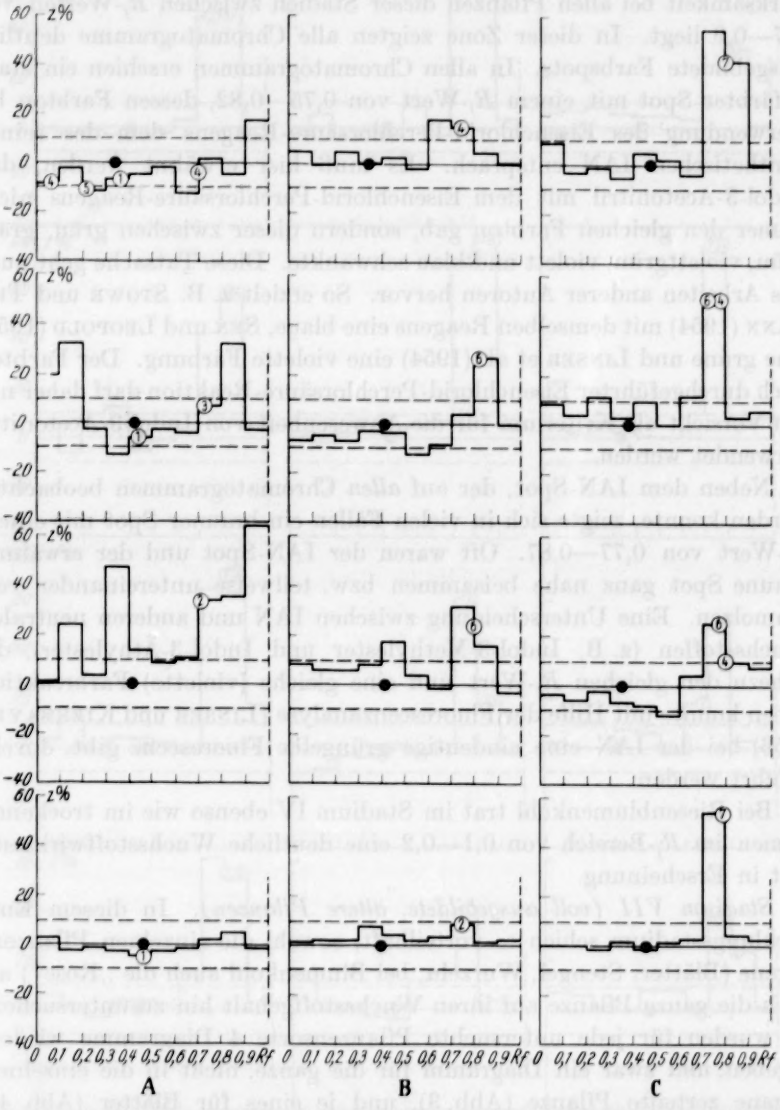


Abb. 1 A—C. Ergebnisse des Pastentestes (Z %) für die einzelnen Abschnitte des Papierchromatogramms (R_f). Oberste Reihe: Sproßenkohl, zweite Reihe: Wirsingkohl, dritte Reihe: Riesenblumenkohl, unterste Reihe: Sommerraps. Reihe A: Stadium I (trockene Samen); Reihe B: Stadium II (angekeimte Samen); Reihe C: Stadium III (Jungpflanzen); Farbbezeichnung: 1 . . .gelb 2 . . .grün 3 . . .blau 4 . . .braun 5 . . .rot 6 . . .violett 7 . . .braungrün (Farbbezeichnungen und Reihenfolge der Pflanzen beziehen sich auch auf die folgenden Abbildungen)

eine gemeinsame Besprechung, zumal sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Entwicklungsstadien zeigten.

Aus Abb. 1C (Stadium III), Abb. 2A (Stadium IV), Abb. 2B (Stadium V) und Abb. 2C (Stadium VI) ist ersichtlich, daß die Wuchsstoffwirksamkeit bei allen Pflanzen dieser Stadien zwischen R_f-Werten von 0,7—0,9 liegt. In dieser Zone zeigten alle Chromatogramme deutlich ausgebildete Farbspots. In allen Chromatogrammen erschien ein stark gefärbter Spot mit einem R_f-Wert von 0,75—0,82, dessen Farbton bei Verwendung des Eisenchlorid-Perchlorsäure-Reagens dem des reinen synthetischen IAN entsprach. Es muß hier erwähnt werden, daß Indol-3-Acetonitril mit dem Eisenchlorid-Perchlorsäure-Reagens nicht immer den gleichen Farbton gab, sondern dieser zwischen grün, graugrün, violettgrün, violett und blau schwankte. Diese Tatsache geht auch aus Arbeiten anderer Autoren hervor. So erzielt z. B. Stowe und Thimann (1954) mit demselben Reagens eine blaue, Sen und Leopold (1954) eine grüne und Linser et al. (1954) eine violette Färbung. Der Farbton nach durchgeführter Eisenchlorid-Perchlorsäure-Reaktion darf daher nur mit Vorsicht als Kriterium für die Anwesenheit von Indol-3-Acetonitril verwendet werden.

Neben dem IAN-Spot, der auf *allen* Chromatogrammen beobachtet werden konnte, zeigte sich in vielen Fällen ein brauner Spot mit einem R_f-Wert von 0,77—0,87. Oft waren der IAN-Spot und der erwähnte braune Spot ganz nahe beisammen bzw. teilweise untereinander verschmolzen. Eine Unterscheidung zwischen IAN und anderen neutralen Wuchsstoffen (z. B. Indol-3-Methylester und Indol-3-Äthylester), die nahezu den gleichen R_f-Wert und eine gleiche (violette) Farbreaktion geben konnte mit Hilfe der Fluorescenzanalyse (Linser und Kiermayer 1956) bei der IAN eine eindeutige grüngelbe Fluorescenz gibt, durchgeführt werden.

Bei Riesenblumenkohl trat im Stadium IV ebenso wie im trockenen Samen im R_f-Bereich von 0,1—0,2 eine deutliche Wuchsstoffwirksamkeit in Erscheinung.

Stadium VII (voll ausgebildete, ältere Pflanzen). In diesem Entwicklungsstadium schien es vorteilhaft, sowohl die einzelnen Pflanzenorgane (Blätter, Stengel, Wurzeln, bei Blumenkohl auch die „Rose") als auch die ganze Pflanze auf ihren Wuchsstoffgehalt hin zu untersuchen. Es wurden für jede untersuchte Pflanzensorte 4 Diagramme wiedergegeben, und zwar ein Diagramm für die ganze, nicht in die einzelnen Organe zerteilte Pflanze (Abb. 3), und je eines für Blätter (Abb. 4), Stengel (Abb. 4B) und Wurzeln (Abb. 4C).

Ganze Pflanze. Die Chromatogramme, die aus Extrakten von ganzen Pflanzen des VII. Stadiums erhalten wurden, zeigten in einem R_f-Bereich von 0,6—0,9 starke Wuchsstoffwirksamkeit. In dieser Zone konnten stets starke IAN-Spots gefunden werden. Der früher beschriebene braune Spot trat auch hier allgemein auf. *Es darf mit Sicherheit*

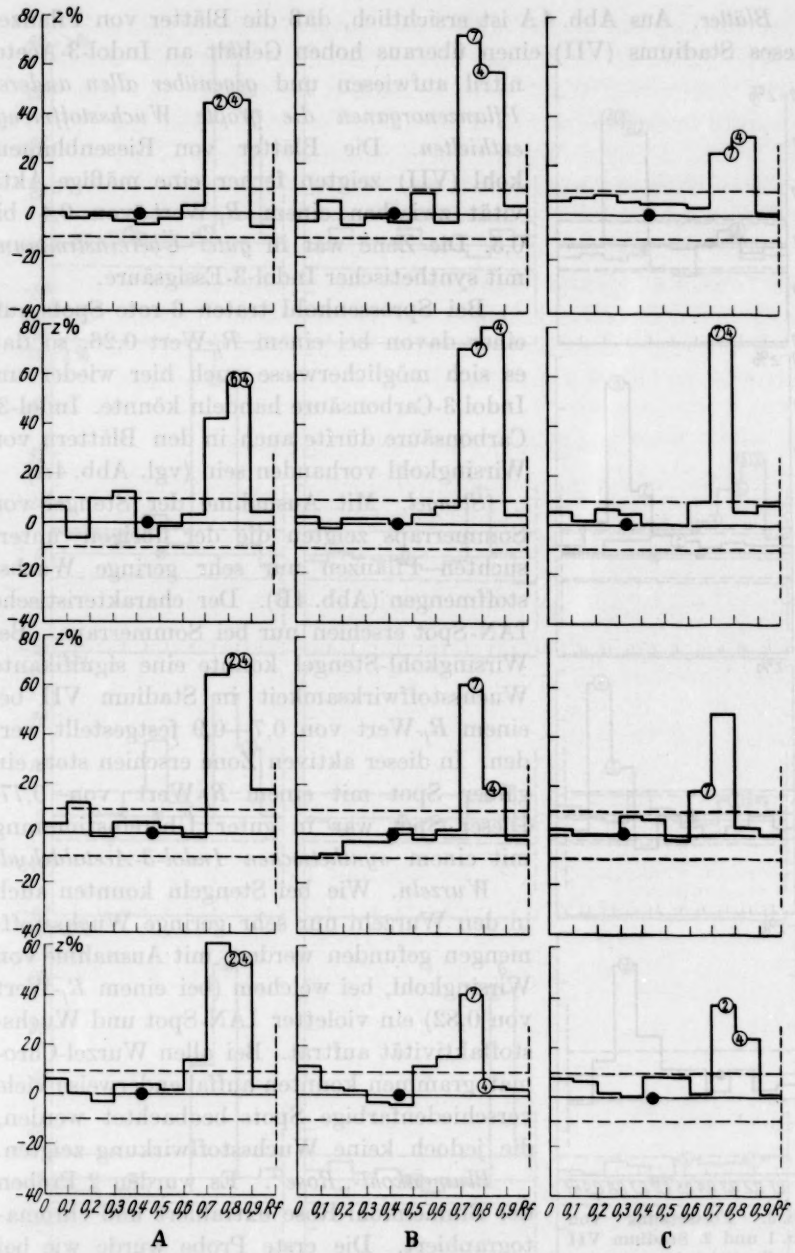


Abb. 2 A—C. Fortsetzung von Abb. 1. Reihe A: Stadium IV; Reihe B: Stadium V; Reihe C: Stadium VI

gesagt werden, daß der größte Teil der Wuchsstoffwirksamkeit auch hier auf der Anwesenheit des Indol-3-Acetonitrils beruht.

Blätter. Aus Abb. 4A ist ersichtlich, daß die Blätter von Pflanzen dieses Stadiums (VII) einen überaus hohen Gehalt an Indol-3-Acetonitril aufwiesen und *gegenüber allen anderen Pflanzenorganen die größte Wuchsstoffmenge enthielten.* Die Blätter von Riesenblumenkohl (VII) zeigten ferner eine mäßige Aktivität zwischen einem R_f-Wert von 0,4 bis 0,5. Die Zone war in *guter Übereinstimmung* mit synthetischer Indol-3-Essigsäure.

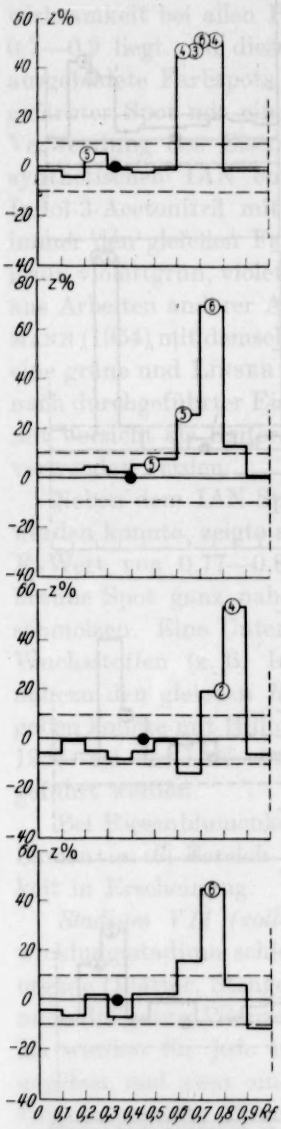


Abb. 3. Fortsetzung von Abb. 1 und 2. Stadium VII (vollentwickelte, ganze Pflanzen)

Bei Sprossenkohl traten 3 rote Spots auf, einer davon bei einem R_f-Wert 0,26, so daß es sich möglicherweise auch hier wieder um Indol-3-Carbonsäure handeln könnte. Indol-3-Carbonsäure dürfte auch in den Blättern von Wirsingkohl vorhanden sein (vgl. Abb. 4A).

Stengel. Mit Ausnahme der Stengel von Sommerraps zeigten die der übrigen untersuchten Pflanzen nur sehr geringe Wuchsstoffmengen (Abb. 4B). Der charakteristische IAN-Spot erschien nur bei Sommerraps. Bei Wirsingkohl-Stengel konnte eine signifikante Wuchsstoffwirksamkeit in Stadium VII bei einem R_f-Wert von 0,7—0,9 festgestellt werden. In dieser aktiven Zone erschien stets ein gelber Spot mit einem R_f-Wert von 0,77. Dieser Spot war in guter Übereinstimmung mit einem *synthetischen Indol-3-Acetaldehyd.*

Wurzeln. Wie bei Stengeln konnten auch in den Wurzeln nur sehr geringe Wuchsstoffmengen gefunden werden, mit Ausnahme von Wirsingkohl, bei welchem (bei einem R_f-Wert von 0,82) ein violetter IAN-Spot und Wuchsstoffaktivität auftrat. Bei allen Wurzel-Chromatogrammen konnten auffallenderweise viele verschiedenfarbige Spots beobachtet werden, die jedoch keine Wuchsstoffwirkung zeigten.

Blumenkohl-„Rose". Es wurden 2 Proben der Blumenkohl-Rose extrahiert und chromatographiert. Die erste Probe wurde wie bei allen bisher beschriebenen Versuchen im Pastentest, Probe 2 dagegen im Zylindertest nach Kiermayer (1956), der eine höhere Empfindlichkeit zeigt, geprüft. In beiden Fällen erschien mit dem Eisenchlorid-Perchlor-

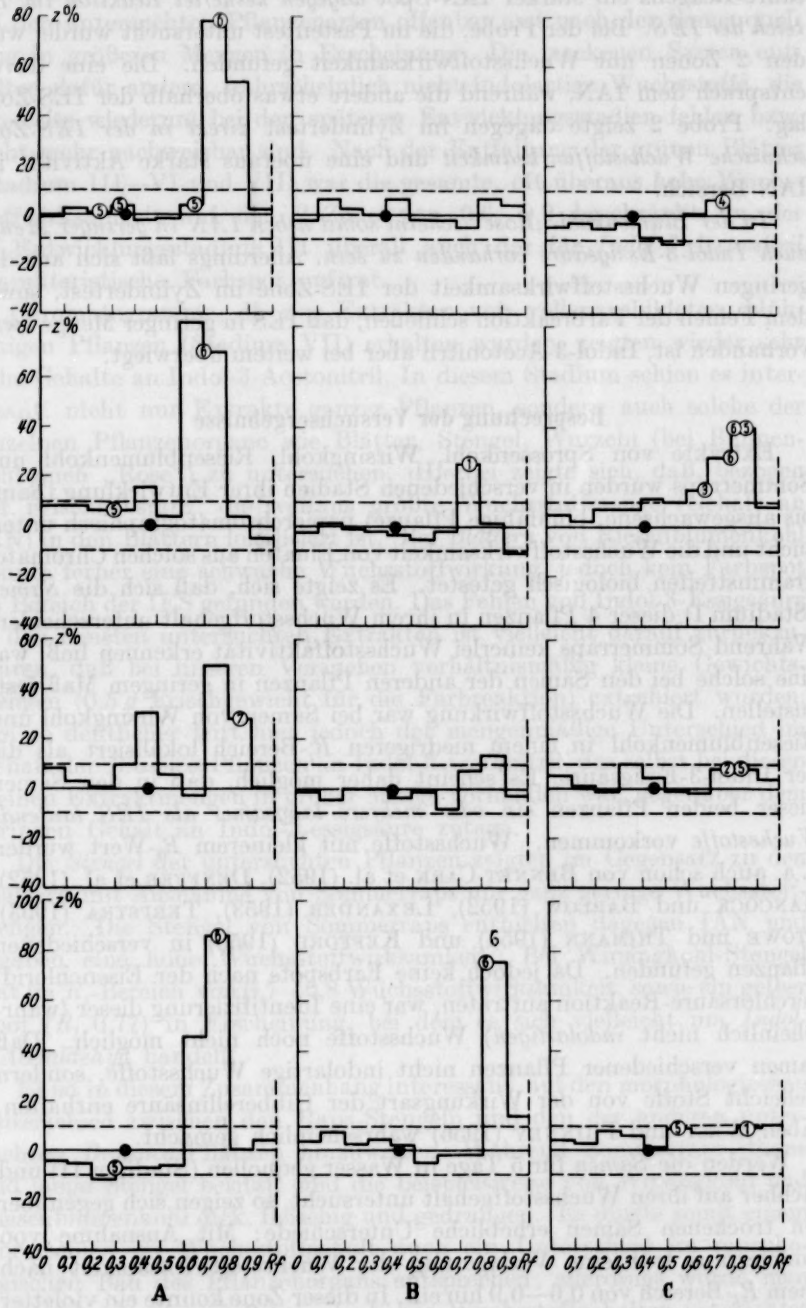


Abb. 4 A—C. Fortsetzung von Abb. 1, 2 und 3. Reihe A: Blätter, Reihe B: Stengel, Reihe C: Wurzeln

säure-Reagens ein starker IAN-Spot *dagegen keinerlei Reaktion im Bereich der IES*. Bei der Probe, die im Pastentest untersucht wurde, wurden 2 Zonen mit Wuchsstoffwirksamkeit gefunden. Die eine davon entsprach dem IAN, während die andere etwas oberhalb der IES-Zone lag. Probe 2 zeigte dagegen im Zylindertest *direkt in der IES-Zone schwache Wuchsstoffwirksamkeit* und eine überaus starke Aktivität im IAN-Bereich.

In der Blumenkohl-„Rose" scheint somit neben IAN in geringer Menge auch Indol-3-Essigsäure vorhanden zu sein. Allerdings läßt sich aus der geringen Wuchsstoffwirksamkeit der IES-Zone im Zylindertest, sowie dem Fehlen der Farbreaktion schließen, daß IES in geringer Menge zwar vorhanden ist, Indol-3-Acetonitril aber bei weitem überwiegt.

Besprechung der Versuchsergebnisse

Extrakte von Sprossenkohl, Wirsingkohl, Riesenblumenkohl und Sommerraps wurden in verschiedenen Stadien ihrer Entwicklung (Same bis ausgewachsene, blühfähige Pflanze) papierchromatographisch untersucht und die Wuchsstoffwirksamkeit von Eluaten aus solchen Chromatogrammstreifen biologisch getestet. Es zeigte sich, daß sich die *Samen* (Stadium I) dieser 4 Pflanzen in ihrem Wuchsstoffgehalt unterscheiden. Während Sommerraps keinerlei Wuchsstoffaktivität erkennen ließ, war eine solche bei den Samen der anderen Pflanzen in geringem Maß festzustellen. Die Wuchsstoffwirkung war bei Samen von Wirsingkohl und Riesenblumenkohl in einem niedrigeren R_f-Bereich lokalisiert als die der Indol-3-Essigsäure. Es scheint daher möglich, daß in den Samen dieser beiden Pflanzen *ein oder mehrere langsamer als IES laufende Wuchsstoffe* vorkommen. Wuchsstoffe mit kleinerem R_f-Wert wurden u. a. auch schon von Bennet-Cark et al. (1952), Denffer et al. (1952), Hancock und Barlow (1952), Lexander (1953), Terpstra (1953), Stowe und Thimann (1954) und Kefford (1955) in verschiedenen Pflanzen gefunden. Da jedoch keine Farbspots nach der Eisenchlorid-Perchlorsäure-Reaktion auftraten, war eine Identifizierung dieser (wahrscheinlich nicht *indolartigen*) Wuchsstoffe noch nicht möglich. Daß Samen verschiedener Pflanzen nicht indolartige Wuchsstoffe, sondern vielleicht Stoffe von der Wirkungsart der Gibberellinsäure enthalten, haben West und Phinney (1956) wahrscheinlich gemacht.

Werden die *Samen* für 5 Tage in Wasser gequollen (Stadium II) und nachher auf ihren Wuchsstoffgehalt untersucht, so zeigen sich gegenüber den trockenen Samen erhebliche Unterschiede: Mit Ausnahme von Sommerraps trat eine Verlagerung der Wuchsstoffwirksamkeit nach einem R_f-Bereich von 0,6—0,9 hin ein. In dieser Zone konnte ein violetter Farbspot beobachtet werden, der in guter Übereinstimmung mit jenem von synthetischem Indol-3-Acetonitril war. Dieser Stoff, der von nun

an in allen Stadien der Entwicklung festgestellt werden konnte, tritt bei den untersuchten Pflanzenarten offenbar erst nach der Samenquellung in größeren Mengen in Erscheinung. Die trockenen Samen enthalten dafür andere, wahrscheinlich nicht indolartige Wuchsstoffe, die ihrerseits wiederum bei den späteren Entwicklungsstadien fehlen bzw. nicht mehr nachweisbar sind. Nach der Entfaltung der grünen Blätter (Stadium III—VI und VII) war die gesamte, oft überaus hohe Wuchsstoffwirksamkeit auf die R_f-Zone von 0,6—0,9 beschränkt, in der ab Entwicklungsstadium III überall auch der für *Indol-3-Acetonitril* charakteristische Farbspot auftrat.

Chromatogramme, die aus Extrakten von vollausgebildeten, blühfähigen Pflanzen (Stadium VII) erhalten wurden, zeigten wieder sehr hohe Gehalte an Indol-3-Acetonitril. In diesem Stadium schien es interessant, nicht nur Extrakte ganzer Pflanzen, sondern auch solche der einzelnen Pflanzenorgane wie Blätter, Stengel, Wurzeln (bei Blumenkohl auch „Rose") zu untersuchen. Hierbei zeigte sich, daß, bezogen auf Frischsubstanz, die weitaus größte Wuchsstoffmenge (Gehalt an IAN) in den Blättern lokalisiert ist. Bei *Blättern* von Riesenblumenkohl konnte ferner eine schwache Wuchsstoffwirkung, jedoch kein Farbspot im Bereich der IES gefunden werden. Das Fehlen von Indol-3-Essigsäure in den meisten untersuchten Extrakten ist vielleicht darauf zurückzuführen, daß bei unseren Versuchen verhältnismäßig kleine Gewichtsmengen (0,5 g Frischgewicht für die Farbreaktion) extrahiert wurden. Um so deutlicher tritt hier jedoch der mengenmäßige Unterschied im Gehalt der *Brassica*-Pflanzen an Indol-3-acetonitril, das selbst bei diesen kleinen Extraktmengen in großer Menge vorhanden war, gegenüber dem geringen Gehalt an Indol-3-essigsäure zutage.

Die *Stengel* der untersuchten Pflanzen zeigten im Gegensatz zu den Blättern mit Ausnahme von Sommerraps nur ganz geringe Wuchsstoffmengen. Die Stengel von Sommerraps enthielten dagegen IAN und ergaben eine hohe Wuchsstoffwirksamkeit. Bei Wirsingkohl-Stengel trat im R_f-Bereich von 0,7—0,8 Wuchsstoffwirksamkeit, sowie ein gelber Spot (R_f 0,77) in Erscheinung, bei dem es sich vielleicht um *Indol-3-Acetaldehyd* handelt.

Es ist in diesem Zusammenhang interessant, auf den morphologischen Unterschied zwischen den Raps-Stengeln und den der anderen untersuchten *Brassica*-Pflanzen hinzuweisen: Während Sommerraps dünne und lange Stengel besitzt, sind die beispielsweise von Wirsingkohl und Riesenblumenkohl dick, fleischig und gedrungen. Es dürfte somit einem Unterschied im Wuchsstoffgehalt auch ein Unterschied im morphologischen Bau des Pflanzenorgans entsprechen; allerdings würde man zunächst vermuten, daß bei sehr hohen Wuchsstoffgehalten verstärktes Dickenwachstum auftreten müßte und gefördertes Längenwachstum an

solchen Pflanzen zu beobachten sei, bei welchen relativ kleine (eben noch fördernd wirkende) Wuchsstoffkonzentrationen den Wuchsstoffspiegel in der Pflanze ausmachen. Daß nun im vorliegenden Falle der Raps die höheren Wuchsstoffgehalte bei stärkerem Streckungswachstum zeigt, könnte ebenfalls als Hinweis darauf aufgefaßt werden, daß bei den wuchsstoffreicheren Pflanzen der größte Teil des Wuchsstoffes in unwirksamer Form vorliegt. Das würde besagen, daß solche Pflanzen eine verstärkte Fähigkeit besitzen, ihren eigenen Wuchsstoffspiegel trotz hoher Wuchsstoffproduktion sehr niedrig zu halten, indem sie eben sehr schnell größere Wuchsstoffmengen zu unwirksamer Form abzuzweigen imstande sind. Diese Vermutung bedarf allerdings näherer experimenteller Untersuchung.

Es ist ferner interessant zu sehen, daß die großen Mengen an Indol-3-Acetonitril mit Ausnahme von Sommerraps nur in den Blättern lokalisiert sind und dort offenbar gespeichert werden, zumal die Stengel relativ arm an IAN sind. Das ist vielleicht so erklärlich, daß entweder kein Transport an IAN von den Blättern in den Stengel stattfindet, oder aber daß transportierte IAN im Stengel inaktiviert wird. Vielleicht steht auch die eigenartige Form und Größe der Blätter vieler *Brassica*-Pflanzen in einer Beziehung zu deren enorm hohen Wuchsstoffgehalt.

Die *Wurzeln* aller untersuchten Pflanzen mit Ausnahme von Wirsingkohl, bei welchem IAN gefunden werden konnte, waren überaus wuchsstoffarm. Dafür traten aber verschiedene gefärbte Spots ohne Wirksamkeit auf. Ob es sich bei allen dieser Farbspots um Indolderivate handelt, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, zumal Stowe, Thimann und Kefford (1956) fanden, daß die Salkowski-Reaktion für Indolderivate keinesfalls spezifisch ist. Den wuchsstoffunwirksamen Spots wurde deshalb in der vorliegenden Arbeit weniger Beachtung geschenkt. In der Blumenkohl-„Rose" konnte neben dem hohen Gehalt an IAN auch eine geringe Menge an Indol-3-Essigsäure gefunden werden. Diese war aber im Vergleich zu Indol-3-Acetonitril in einer so geringen Menge vorhanden, daß auch hier der Indol-3-Acetonitril als dominierender Wuchsstoff anzusehen ist.

Bei Sprossenkohl (Stadium I und VI), Wirsingkohl (Stadium II) und Riesenblumenkohl (Stadium III und VII) zeigte sich im R_f-Bereich von 0,5—0,7 eine deutliche Hemmwirkung. Auch bei vielen anderen der hier gebrachten Diagramme zeigt sich in diesem R_f-Bereich eine hemmende Tendenz. Auf diese interessante Tatsache, die nicht nur bei *Brassica*-Pflanzen, sondern auch bei Pflanzen aus anderen Familien festgestellt werden konnte, soll in einer weiteren Arbeit näher eingegangen werden.

Zusammenfassung

1. Vier *Brassica*-Pflanzen, und zwar Sprossenkohl, Wirsingkohl, Riesenblumenkohl und Sommerraps wurden in verschiedenen Stadien ihrer Entwicklung mit Hilfe der Papierchromatographie und eines biologischen Testes (Pastentest) auf ihren Wuchsstoffgehalt hin untersucht.

2. In Samen von Riesenblumenkohl und Wirsingkohl konnten langsamer als Indol-3-Essigsäure laufende, wahrscheinlich nicht indolartige Wuchsstoffe gefunden werden.

3. Indol-3-Acetonitril (IAN) trat erst auf, sobald die Samen in Wasser gequollen wurden. Mit dem Auftreten des Indol-3-Acetonitrils verschwanden die nichtindolartigen Wuchsstoffe, die in trockenen Samen gefunden werden konnten.

4. Im trockenen Samen von Sprossenkohl und in den Blättern von Sprossenkohl und Wirsingkohl konnte mit großer Wahrscheinlichkeit Indol-3-Carbonsäure festgestellt werden.

5. Bei Sommerraps zeigten sowohl trockene als auch gequollene Samen keine signifikante Wuchsstoffwirksamkeit.

6. Nach der Ausbildung der grünen Blätter konnte in allen Entwicklungsstadien Indol-3-Acetonitril als dominierender Wuchsstoff gefunden werden.

7. Die Hauptmenge an Indol-3-Acetonitril fand sich in den Blättern.

8. In den Stengeln konnte kein IAN nachgewiesen werden, mit Ausnahme von Sommerraps, dessen Stengel sich auch morphologisch von den anderen untersuchten *Brassica*-Pflanzen unterscheiden. Durch das Fehlen von IAN in den Stengeln wird vermutet, daß größere Mengen an IAN aus den Blättern nicht abtransportiert oder aber im Stengel inaktiviert werden.

9. Mit Ausnahme von Wirsingkohl fanden sich in den Wurzeln nur äußerst geringe Wuchsstoffmengen, dafür eine erhöhte Anzahl verschiedenfarbiger, unwirksamer Spots.

10. Außer IAN konnten in Blumenkohlblättern und in der Blumenkohlrose geringe Mengen an Indol-3-Essigsäure, in Wirsingkohlstengel möglicherweise Indol-3-Acetaldehyd nachgewiesen werden.

11. Im R_f-Bereich von 0,5—0,7 zeigte sich in vielen Fällen eine hemmende Tendenz.

Literatur

Bennet-Clark, T. A., M. S. Tambiah and N. P. Kefford: Estimation of plant growth substances by partition chromatography. Nature (Lond.) **169**, 452 (1952). — Denffer, D. v., M. Behrens u. A. Fischer: Papierchromatographische Trennung von Indolderivaten aus Pflanzenextrakten. Naturwiss. **39**, 258 (1952a). — Denffer, D. v., M. Behrens u. A. Fischer: Papierchromatographischer und papierelektrophoretischer Nachweis des β-Indolacetonitrils und des β-Indolaldehyds in Extrakten aus Kohlpflanzen. Naturwissenschaften **39**, 550—551 (1952b). — Fischer, A.: Über die papierchromatographische und papierelektrophoretische

Trennung von Indolderivaten. Planta (Berl.) **43**, 288—314 (1954). — Gordon, S. D., and R. P. Weber: Colorimetric estimation of indoleacetic acid. Plant Physiol. **26**, 192—195 (1951). — Hancock, C. R., and H. W. B. Barlow: The assay of growth substances by a modified straight growth method. Ann. Rep. East Malling Res. St. **1952**, 88—94. — Holley, R. W., F. P. Boyle, H. K. Durfee and A. D. Holley: A study of the auxins in cabbage using counter-current distrubution. Arch. Biochem. **32**, 192—199 (1951). — Jones, E. R. H., H. B. Henbest, G. F. Smith and J. A. Bentley: 3-Indoleacetonitrile a naturelly occuring plant growth hormone. Nature (Lond.) **169**, 485 (1952). — Kefford, N. P.: The growth substances separated from plant extracts by chromatography. I. J. exp. Bot. **6**, 129—151 (1955). — Kiermayer, O.: Eine einfache Arbeitsweise für den Koleoptilzylindertest. Planta (Berl.) **47**, 527—531 (1956). — Lexander, K.: Growth — regulating substances in roots of wheat. Physiol. Plantarum (Cph.) **6**, 406—411 (1953). — Linser, H.: Zur Methodik der Wuchsstoffbestimmung. I. Planta (Berl.) **28**, 227—265 (1938); II. Planta (Berl.) **29**, 392—408 (1939). — Über die Wirkung von Indol-3-Essigsäure auf das Längenwachstum von Keimlingen verschiedener *Brassica*-Arten. Planta (Berl.) **43**, 440—445 (1954). — Linser, H., u. O. Kiermayer: Fluoreszenzanalytischer Nachweis von Indolkörpern insbesondere Indol-3-Acetonitril auf Papierchromatogrammen. Biochim. biophys. Acta **21**, 382 (1956).— Methoden zur Bestimmung pflanzlicher Wuchsstoffe. Wien: Springer 1957. — Linser, H., H. Mayr u. F. Maschek: Papierchromatographie von zellstreckend wirksamen Indolkörpern aus *Brassica*-Arten. Planta (Berl.) **44**, 103—120 (1954). — Sen, S. P., and A. C. Leopold: Paper chromatography of plant growth regulators and allied compounds. Physiol. Plantarum (Cph.) **7**, 98—108 (1954). — Stowe, B. B., and K. V. Thimann: The paper chromatography of indole compounds and some indole-containing auxins of plant tissues. Arch. Biochem. **51**, 499—516, (1954). — Stowe, B. B., K. V. Thimann and N. P. Kefford: Further studies of some plant indoles and auxins by paper chromatography. Plant. Physiol. **31**, 162—165 (1956). — Terpstra, W.: Extraction and identification of growth substances. Diss. Utrecht 1953. — Vlitos, A. J., and W. Meudt: The role of auxin in plant flowering. I. A quantitative method based on paper chromatography for the determination of indole compounds and of 3-indolacetic acid in plant tissues. Contrib. Boyce Thompson Inst. **17**, 197—202 (1953). — Weller, L. E., S. H. Wittwer and H. M. Sell: The detection of 3-indoleacetic acid in cauliflower heads. Chromatographic behavior of some indole compounds, J. Amer. chem. Soc. **76**, 629—630 (1954). — West, C. A., and B. O. Phinney: Properties of gibberellin-like factors from extracts of higher plants. Plant Physiol. **31**, 20 (1956). — Youssef, E., u. O. Kiermayer: Zur Photolyse von Indol-3-acetonitril. Planta (Berl.) **49**, 607—611 (1957).

Priv.-Doz. Dr. H. Linser, Dr. O. Kiermayer, Dr. E. Youssef,
Biologische Forschungsabteilung der Österreichische Stickstoffwerke AG,
Linz a. d. Donau, Haag 19 (Österreich)

Planta, Bd. 52, S. 187—194 (1958)

Aus der Bundesforschungsanstalt für Lebensmittelfrischhaltung, Karlsruhe

BILDUNG EINES ROTEN FARBSTOFFES IN VERLETZTEM PFLANZENGEWEBE

Von

ERWIN WINTER

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 23. Juni 1958)

In verschiedenen Gemüsepflanzen ist eine starke Zunahme des Gehaltes an Ascorbinsäure zu verzeichnen, wenn zerschnittene Gewebeteile dieser Pflanzen unter Belüftung 24 Std oder länger in Wasser suspendiert werden (WINTER 1952). Gleichzeitig mit dieser Zunahme färbt sich bei *Cichorium endivia* die wäßrige Lösung auffällig rot (WINTER 1958), und es tritt ein schwacher, fruchtartiger, an Orangenschalen erinnernder Geruch auf. Die Bildungsbedingungen des roten Farbstoffes sowie seine Eigenschaften werden in der vorliegenden Arbeit näher beschrieben. Da der Farbstoff sich bisher nicht mit einem schon beschriebenen Stoff gleichsetzen ließ, soll für ihn im folgenden der Name „Intybin"[1] gebraucht werden.

Methodisches

1. Behandlung. Die herausgeschnittenen Mittelrippen der Blätter von *Cichorium endivia*, var. *latifolium* wurden quer in 1—2 mm dicke Scheiben bzw. Streifen zerschnitten. Auch die ganzen Blätter waren verwendbar, jedoch ließen sich die zerschnittenen Rippen beim Belüften besser handhaben. Die Schnitte wurden in die 10—20fache Menge Leitungswasser gebracht und unter dreimaligem Wasserwechsel 2 Std durch eine Glasfritte belüftet. Dann wurden 20 g der Schnitte in 300 ml einer 0,01 m[2] Lösung von analysenreinem Kaliumbicarbonat in destilliertem Wasser gebracht und 42 Std lang weiterbelüftet. An der Wand des zylindrischen Gefäßes anliegend und zugleich auf dem Boden aufstehend befand sich ein Ring aus längsgefaltetem V 2A-Drahtnetz, in welchen ein Filterpapierstreifen 2 × 15 cm, Schleicher & Schüll Nr. 595, eingelegt war. Nach Beendigung des Versuches wurde der durch das adsorbierte Intybin rot angefärbte Papierstreifen herausgenommen, gewässert, zunächst an der Luft und anschließend im Exsikkator über Blaugel getrocknet. Gleichzeitig mit diesem als Kontrolle dienenden Versuch mit Kaliumbicarbonatlösung wurden 5 weitere, gleichartige Versuche mit anderen Lösungen bzw. anderem Pflanzengewebe ausgeführt.

Die verwendete Luft wurde durch A-Kohle und Watte von Verunreinigungen befreit. Während und nach der Behandlung mußten die gefärbten Lösungen und Filterpapiere vor Licht geschützt oder im Dunkeln gehalten werden, da das Intybin lichtempfindlich ist. Der p_H-Wert wurde zu Beginn und am Ende der Versuche mit einer hochohmigen Glaselektrode von Schott gemessen. Die Versuchstemperatur betrug 20—25° C.

[1] Lat. *intybus*, Endivie.

[2] m = molar.

2. Nachweis. Aus der Farbtiefe des Filterpapiers wurde auf die Menge des gebildeten Farbstoffes geschlossen. Zur raschen Orientierung genügten Vergleichsfarbmuster, deren Farbton mit Hilfe eines Photovolt-Farbmeßgerätes festgelegt worden war. Für eine genauere Bestimmung wurde die Extinktion des gefärbten Filterpapiers gegen ein leeres im Zeiß Colorimeter Elko II mit Filter S 53 gemessen. Es ergaben sich die Extinktionen: Spur rosa 0,1; schwach rosa 0,2; rosa 0,3; stark rosa 0,5; hellrot 0,7; rot 1,0. Im Unicam Spektralphotometer SP 500 ergaben sich bei 545 mμ nahezu dieselben Extinktionswerte wie im Elko II mit Filter S 53.

3. Gewinnung. Bei der Gewinnung des Intybins wurde wie unter „Behandlung" jedoch in etwa 10fach vergrößertem Maßstab und unter Anwendung der unten angegebenen günstigsten Bildungsbindungen verfahren. Das Filterpapier wurde außerdem nach 21 Std erneuert. Zur Isolierung wurden die gefärbten trockenen Filterstreifen im Soxlethgerät unter sauerstofffreiem Stickstoff zunächst mit Äthyläther, dann bei 150 mm Hg mit Methanol ausgezogen und der Methanolauszug im Vakuum bei 45° C zur Trockne verdampft. Der erhaltene Farbstoff wurde im Vakuumexsikkator über konzentrierter Schwefelsäure aufbewahrt.

Bildungsbedingungen

Belüftet man zerschnittene Blätter von *Cichorium endivia* in Leitungswasser (Wasserhärte 19° DH), so färbt sich gleichzeitig eingebrachtes Filterpapier im Verlauf von 1—2 Tagen blaustichig rot an. Auch Baumwollgewebe läßt sich auf diese einfache Weise leuchtend purpurrot anfärben, jedoch ist die Färbung nicht lichtecht. Die Bildung des Intybins hält im allgemeinen mehrere Tage an. Die Entstehung des Farbstoffes ist in starkem Maße vom Lebenszustand des Versuchsgutes, vom p_H-Wert der umgebenden Lösung und von der Anwesenheit fremder Stoffe in der Lösung oder der eingeleiteten Luft abhängig.

1. Lebenszustand. Das Intybin bildet sich nur im lebenden Pflanzengewebe. Wird das Gewebe vor dem Versuch abgetötet, z. B. durch Narkotika wie Äther und Chloroform oder durch Gifte wie Quecksilbersalze, so tritt keine Farbstoffbildung ein. Auch bei angewelkten Blättern bleibt sie aus. Sauerstoffmangel verhindert sie ebenfalls, während Belichtung ohne merklichen Einfluß ist. Eine weitere Bedingung für die Bildung des Intybins ist die Verletzung des Zellgewebes, welche jedoch nicht zu einer allzu starken Zerkleinerung führen darf. Gewebebrei bildet keinen Farbstoff mehr.

2. p_H-Wert. Einen ausschlaggebenden Einfluß auf die Entstehung des Farbstoffes hat die Wasserstoffionenkonzentration. Der Preßsaft von *Cichorium endivia* besitzt einen p_H-Wert von 6,1—6,7, und die zerschnittenen Blätter zeigen eine erhebliche Fähigkeit, den p_H-Wert der umgebenden Lösung diesem Wert anzugleichen, so daß eine ziemlich hohe Pufferkapazität nötig ist, um einen bestimmten p_H-Wert in der Suspensionsflüssigkeit aufrechtzuerhalten. Abb. 1 zeigt die p_H-Abhängigkeit der Bildung von Intybin, wobei die Werte zwischen p_H 4 und 7 mit 0,05 m Maleinatpuffer (SMITS 1947) und zwischen p_H 9 und 10 mit 0,05 m Carbonatpuffer (BATES und BOWER 1956) eingestellt wurden.

Zwischen p_H 7 und 9 stand kein geeigneter Puffer zur Verfügung, da die gebräuchlichen Puffer mit Phosphat, Barbiturat, Triäthanolamin und Tris die Farbstoffbildung hemmten bzw. vollständig verhinderten. Die angeführten Werte zwischen p_H 8 und 9 ergaben sich bei Versuchen mit 0,005—0,01 m Kaliumbicarbonatlösungen. Die Zunahme bzw. Abnahme des p_H-Wertes vom Beginn bis zum Ende eines Versuches betrug bei diesen Versuchen bis zu 0,5 p_H-Einheiten.

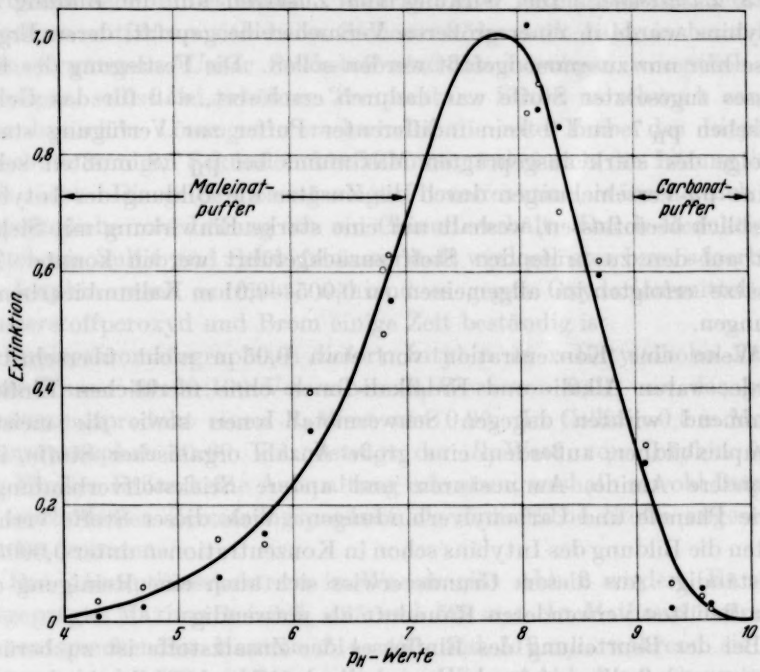


Abb. 1. Abhängigkeit der Intybinbildung vom p_H-Wert bei *Cichorium endivia* aus der Farbtiefe von Filterpapier nach 42 Std Versuchsdauer. Punkte: Spektralphotometer SP 500 bei 545 mμ Wellenlänge; Kreise: Colorimeter Elko II mit Filter S 53

Aus der Kurve geht hervor, daß die Intybinbildung bei *Cichorium endivia* ein ausgeprägtes Optimum bei p_H 7,8 aufweist. Dieses liegt über dem p_H-Wert des Zellsaftes, so daß hieraus auf eine Begünstigung bzw. Reizwirkung durch schwach alkalische Reaktion geschlossen werden kann. Der steilere Abfall bei höheren p_H-Werten spricht nicht dagegen, denn er ist in erster Linie nicht durch eine Verhinderung der Bildung, sondern durch eine Zersetzung des gebildeten Intybins durch Alkali verursacht. Die hellrote Lösung wird infolgedessen bei steigenden p_H-Werten orangefarben und schließlich gelb. Die im Vergleich zu Leitungswasser oder Bicarbonatlösungen weit schwächere Bildung von Intybin in destilliertem Wasser ist ebenfalls dem p_H-Wert zuzuschreiben, welcher hier niedriger und damit weiter entfernt vom Optimum liegt.

Die an sich schon starke Intybinbildung in 0,01 m Kaliumbicarbonatlösung läßt sich noch merklich steigern, wenn man den bei 8,1 liegenden p_H-Wert dieser Lösung durch schwach saure Zusätze etwas herabsetzt. Die größten Ausbeuten wurden erhalten in Gemischen von 0,005 m Kaliumbicarbonat mit 0,005 m Ammoniumchlorid oder 0,005 m Ammoniumacetat. Sie betrugen allerdings auch hier nicht mehr als 0,001% Intybin, bezogen auf das Gewicht des angewandten Pflanzengewebes.

3. Zusatzstoffe. Die Wirkung von Zusätzen auf die Bildung des Intybins wurde in einer größeren Versuchsreihe geprüft, deren Ergebnisse hier nur zusammengefaßt werden sollen. Die Festlegung des Einflusses zugesetzter Stoffe war dadurch erschwert, daß für das Gebiet zwischen p_H 7 und 9 kein indifferenter Puffer zur Verfügung stand. Infolge des stark ausgeprägten Maximums bei p_H 7,8 mußten schon kleine p_H-Verschiebungen durch die Zusätze die Bildung des Intybins erheblich beeinflussen, weshalb nur eine starke Einwirkung mit Sicherheit auf den zu prüfenden Stoff zurückgeführt werden konnte. Die Zusätze erfolgten im allgemeinen zu 0,005—0,01 m Kaliumbicarbonatlösungen.

Wenn eine Konzentration von etwa 0,05 m nicht überschritten wurde, waren Alkali- und Erdalkali-Ionen ohne merklichen Einfluß. Hemmend wirkten dagegen Schwermetall-Ionen sowie die meisten Komplexbildner, außerdem eine große Anzahl organischer Stoffe, insbesondere Amine, Aminosäuren und andere Stickstoffverbindungen sowie Phenole und Carbonylverbindungen. Viele dieser Stoffe verhinderten die Bildung des Intybins schon in Konzentrationen unter 0,0005 m vollständig. Aus diesem Grunde erwies sich auch eine Reinigung der zum Belüften verwendeten Raumluft als notwendig.

Bei der Beurteilung des Einflusses der Zusatzstoffe ist zu berücksichtigen, daß diese entweder innerhalb des Gewebes oder in der umgebenden Lösung wirksam sein können. Bei einer Einwirkung im Pflanzengewebe selbst können entweder der Vorgang der Intybinbildung unmittelbar oder andere mit ihm im Zusammenhang stehende Stoffwechselvorgänge betroffen sein. Es wurde festgestellt, daß eine Reaktion mit dem gelösten Intybin außerhalb des Gewebes in vielen Fällen die Ursache der beobachteten Hemmwirkung war. Eine Begünstigung der Bildung von Intybin konnte dagegen in keinem Falle beobachtet werden. Alle zugesetzten Stoffe zeigten bei einem gegebenen p_H-Wert entweder keinen Einfluß oder eine Hemmung.

Eigenschaften

Intybin enthält Stickstoff und löst sich verhältnismäßig leicht in Methanol, weniger gut in Äthylalkohol, Pyridin und Wasser, kaum in Aceton und ist in den meisten übrigen organischen Lösungsmitteln

unlöslich. Es wird stark adsorbiert an A-Kohle, Talkum und Floridin XXF, schwächer an Cellulose. Von Cellulose läßt es sich mit Methanol in der Wärme wieder ablösen und kann aus dem Abdampfrückstand in schwarzroten Kristallen erhalten werden.

An Cellulose adsorbiert und getrocknet ist Intybin bei Raumtemperatur monatelang haltbar, wenn es vor Licht geschützt wird. Beim Erwärmen über 120° C färbt es sich gelb bis braun. In Lösung ist der Farbstoff sehr unbeständig. Wäßrige und methanolische, neutrale Lösungen entfärben sich beim Stehen an der Luft bald, insbesondere beim Erwärmen. Unter Stickstoff sind die Lösungen wesentlich beständiger, selbst bei erhöhter Temperatur. Schon in schwach sauren oder basischen Lösungen verschwindet die rote Farbe des Intybins innerhalb weniger Sekunden bis Minuten, wobei sich die Lösung hellgelb färbt. Die gelbe Lösung zeigt Phenolreaktion, während sich die ursprüngliche rote Lösung wie ein Chinon verhält. Durch Reduktionsmittel wie Sulfit und Schwefelwasserstoff wird gelöstes bzw. adsorbiertes Intybin rasch entfärbt, während es gegen Oxydationsmittel wie Wasserstoffperoxyd und Brom einige Zeit beständig ist.

Papierchromatographisch liefert Intybin in n-Butylalkohol-Essigsäure-Wasser 80:20:100 Vol. einen R_f-Wert von 0,04 und das gelbe Zersetzungsprodukt einen R_f-Wert von 0,90. In Collidin-0,5 m Monokaliumphosphat 40:60 Vol. beträgt der R_f-Wert von Intybin 0,37. Die Flecken ließen keine Aufspaltung erkennen, weshalb sowohl Intybin als auch dessen Zersetzungsprodukt als einheitliche Stoffe angesehen werden konnten.

Das Absorptionsspektrum in Wasser gibt Abb. 2 wieder. Es zeigt ausgeprägte Maxima bei 205, 495 und 529 mμ. In Methanol betragen die entsprechenden Maxima 214, 485 und 519 mμ, während sie auf Filterpapier bei 508 und 545 mμ liegen. Wie auf Abb. 3 zu erkennen ist, tritt auf Filterpapier bei 334 mμ ein in Lösung nicht vorhandenes, schwaches Maximum auf, während das hohe Maximum im kurzwelligen UV wegen der starken Absorption des Papiers unterhalb 250 mμ nicht mehr gemessen werden kann. Die Verschiebung der Maxima macht sich schon dadurch bemerkbar, daß im Vergleich zur wäßrigen Lösung dem Auge die methanolische Lösung stets gelbstichig rot, das angefärbte Filterpapier dagegen stets blaustichig rot erscheint. Bei der Zersetzung des Intybins durch Säure oder Alkali verschwinden die beiden Maxima um 500 mμ vollständig, während das Maximum im kurzwelligen UV fast unverändert erhalten bleibt. Die bei der Zersetzung auftretende gelbe Färbung ist auf die verbleibende Restabsorption zwischen 400 und 500 mμ zurückzuführen.

Bei den gewonnenen geringen Mengen und der großen Zersetzlichkeit des Intybins war eine Konstitutionsermittlung bisher noch nicht

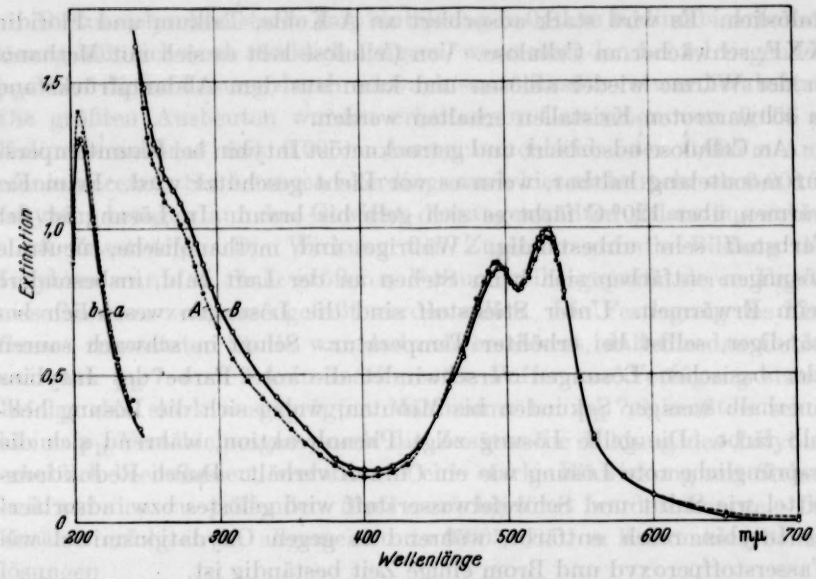


Abb. 2. Absorptionsspektrum von Intybin in wäßriger Lösung aus *Cichorium endivia* (●----● Kurve *A*) und *Lactuca sativa* (○——○ Kurve *B*). Kurven *a* und *b* entsprechen *A* und *B*, jedoch die Lösungen auf $^1/_4$ verdünnt

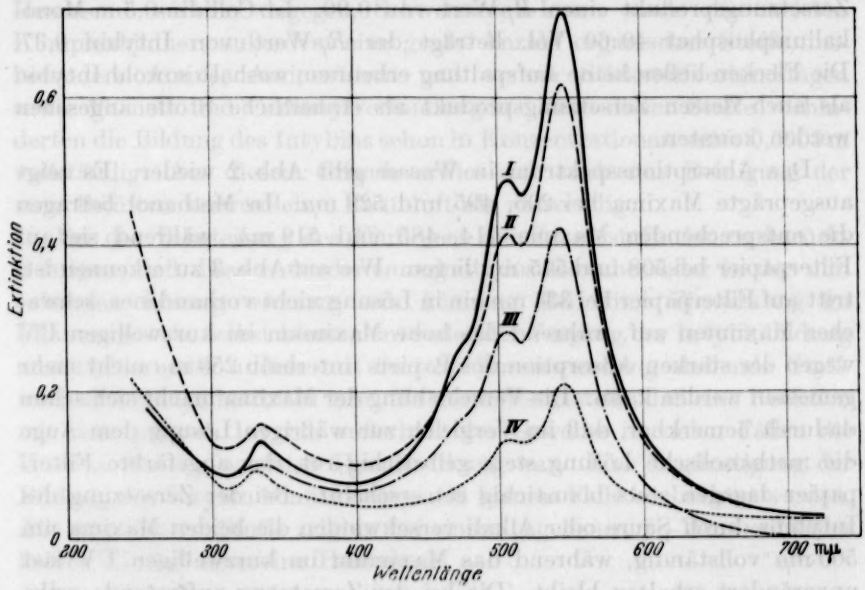


Abb. 3. Absorptionsspektrum von Intybin an Filterpapier adsorbiert, aus *I Cichorium endivia, II Cichorium intybus, III Scorzonera hispanica, IV Dahlia variabilis*

möglich. Die Ähnlichkeit der festgestellten Eigenschaften mit denen der Aminochrome (SOBOTKA, BARSEL und CHANLEY 1957) legt die An-

nahme nahe, daß es sich um einen den Indolchinonen verwandten Farbstoff handelt. Allerdings stimmt das Absorptionsspektrum des Intybins nicht mit den bisher beschriebenen Spektren von Indolchinonderivaten überein. Dies gilt insbesondere für die vom Tyrosin bzw. Dioxyphenylalanin abgeleiteten roten Zwischenstufen der Melaninbildung (Mason 1948), aber auch für die nicht zur Klasse der Aminochrome gehörenden, aus Chinonen mit Aminen entstehenden roten Aminochinone (Jackson und Kendal 1949; Horner und Lang 1956).

Eine Prüfung des Intybins auf antibiotische Wirkung gegen Bacillus subtilis und Staphylococcus aureus SG 511 mit dem Lochplattentest ließ keine Hemmzonen erkennen.

Rolle in der Pflanze

Die Bildung von Intybin ist nicht auf *Cichorium endivia* (Endivie) beschränkt. In ähnlicher Weise läßt sie sich bei *Cichorium intybus* (Wegwarte sowie Chicorée), *Lactuca sativa* (Kopfsalat), *Scorzonera hispanica* (Schwarzwurzel) sowie *Dahlia variabilis* (Dahlie) feststellen. Daß es sich hierbei um denselben Stoff handelt, geht aus der Absorptionskurve für Intybin aus *Lactuca sativa* in Abb. 2 hervor, welche ziemlich genau derjenigen aus *Cichorium endivia* entspricht. Abb. 3 zeigt außerdem einen Vergleich der Absorptionskurven von Intybin aus *Cichorium* endivia (Blatt), *Cichorium intybus* (Blatt), *Scorzonera hispanica* (Wurzel) und *Dahlia variabilis* (Knolle) auf Filterpapier, wobei sich auch hier gleiche Maxima ergeben. Wie die letzten Beispiele zeigen, bildet sich das Intybin nicht nur in Blättern sondern auch in nichtgrünen Pflanzenteilen. Daß es sich im Stamm und in den unterirdischen Sproßteilen bilden kann, geht auch daraus hervor, daß die Schnittfläche des abgeschnittenen Strunks der erwähnten Pflanzen nach einer gewissen Zeit stets eine rote bis rotbraune Färbung annimmt, die durch Intybin hervorgerufen wird.

Bei der Frage der Bedeutung des Intybins für die Pflanze sind in erster Linie zwei Möglichkeiten in Betracht zu ziehen. Einerseits kann das Intybin in der oxydierten bzw. reduzierten Form ein normales Stoffwechselprodukt sein, welches von den unverletzten Zellen über die verletzten Zellen oder von diesen allein nach außen abgegeben wird, ohne daß es dabei eine Veränderung erleidet. Andererseits kann es ähnlich wie die Melanine und andere Stoffe durch oxydative enzymatische oder nichtenzymatische Veränderungen zelleigener Stoffe an oder außerhalb der verletzten Stelle entstanden sein und würde dann kein normales Stoffwechselprodukt darstellen. Die enge Verbundenheit mit dem Lebenszustand des Gewebes spricht mehr für die erste Möglichkeit. Es könnte sich in diesem Fall um ein Zwischenglied der Atmungskette handeln, etwa um den roten Farbstoff, den Waygood (1950) in Weizen-

keimlingen nachgewiesen hat. Dieser noch nicht näher untersuchte Farbstoff hat ähnliche Eigenschaften wie Intybin und wurde in das wasserstoffübertragende Enzymsystem des Weizens als Zwischenglied zwischen Flavin und Ascorbinsäure eingereiht. Damit würde sich auch eine Beziehung zu der gleichzeitig mit der Bildung des Intybins auftretenden Zunahme des Ascorbinsäuregehaltes im Pflanzengewebe ergeben.

Ein Zusammenhang zwischen Intybin und Melaninen wäre trotzdem insofern möglich, als es ähnlich dem Oxydationsprodukt des Dioxyphenylalanins ein natürliches Ausgangsprodukt für die Melaninbildung sein könnte. Allerdings ist die Neigung des Intybins allein zur Bildung von Bräunungsstoffen nur gering, wenn auch beim Erhitzen und langen Lagern braune Umwandlungsprodukte beobachtet wurden. Vor einer Aufklärung der Konstitution, die noch bearbeitet wird, läßt sich jedoch darüber nichts Näheres aussagen.

Zusammenfassung

1. Aus zerschnittenen, belüfteten Blättern von *Cichorium endivia* konnte ein roter, wasserlöslicher Farbstoff gewonnen werden, der „Intybin" genannt wurde.

2. Der stickstoffhaltige Farbstoff, dessen Eigenschaften beschrieben wurden, zeigte das Verhalten eines Chinons. Das Absorptionsspektrum wies Maxima bei 205, 495 und 529 mμ in Wasser sowie bei 214, 485 und 519 mμ in Methanol auf.

3. Aus den Blättern und anderen Pflanzenteilen von *Cichorium intybus*, *Lactuca sativa*, *Scorzonera hispanica* und *Dahlia variabilis* wurde derselbe Farbstoff erhalten. Seine Rolle in der Pflanze wurde diskutiert.

Literatur

Bates, R., and V. Bower: Alkaline solutions for p_H-control. Analyt. Chem. **28**, 1322—1324 (1956). — Horner, L., u. H. Lang: Zur Kenntnis der o-Chinone. IX. Darstellung und Eigenschaften einiger Amino-o-chinone. Chem. Ber. **89**, 2768 bis 2773 (1956). — Jackson, H., and L. Kendal: The oxidation of catechol and homocatechol by tyrosinase in the presence of amino-acids. Biochem. J. **44**, 477 bis 487 (1949). — Mason, H.: The chemistry of melanin. III. Mechanism of the oxidation of dihydroxyphenylalanine by tyrosinase. J. biol. Chem. **172**, 83—99 (1948). — Smits, G.: A new buffer for the p_H-range 5 to 7. Biochim. biophys. Acta **1**, 280 (1947). — Sobotka, H., N. Barsel and J. Chanley: The aminochromes. Fortschr. Chem. organ. Naturstoffe **14**, 217—243 (1957). — Waygood, E.: Physiological and biochemical studies in plant metabolism. II. Respiratory enzymes in wheat. Canad. J. Res. C **28**, 7—62 (1950). — Winter, E.: Ascorbinsäuresynthese in Gewebeschnitten. Planta (Berl.) **41**, 52—58 (1952). — Über einen Pflanzenfarbstoff aus Cichorium. Naturwissenschaften **45**, 40—41 (1958).

Dr. E. Winter,
Bundesforschungsanstalt für Lebensmittelfrischhaltung,
Karlsruhe, Kaiserstraße 12

Planta, Bd. 52, S. 195—205 (1958)

Aus dem Botanischen Institut der Techn. Hochschule Stuttgart
(Direktor: Prof. Dr. A. Arnold)

ÜBER DEN JAHRESGANG EINIGER ZUCKER IN DEN BLÄTTERN VON HEDERA HELIX L.

Von
K. Jeremias

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 4. Juli 1958)

Menge und Art der in den verschiedenen Pflanzenteilen vorkommenden Kohlenhydrate sind keineswegs konstant, sondern neben tagesperiodischen auch jahresperiodischen Schwankungen unterworfen. Seit den Untersuchungen von Mer (1876), Schulz (1888) und vor allem von Lidforss (1896, 1907) gilt als allgemeine Regel, daß die wintergrünen Blätter im Sommer wenig Zucker und viel Stärke, im Winter reichlich Zucker, aber keine oder doch nur sehr wenig Stärke enthalten. Czapek (1901, vgl. auch 1913, S. 483) und später Michel-Durand (1918/19) fanden diese Regel u. a. für Efeu-Blätter bestätigt.

Der Kohlenhydratstoffwechsel und seine Veränderungen in den Blättern einiger Immergrüner, so auch in den Blättern von *Hedera helix*, ist im Laufe eines Jahres besonders eingehend durch Preising (1930) untersucht worden (vgl. dazu v. Guttenberg 1928). Im einzelnen wurden hierbei reduzierende Zucker (als „Glucose"), Saccharose, „Glucosidzucker" und Stärke bestimmt. Während Preising (1930) bezüglich der Stärke die Befunde von Lidforss (1896), Czapek (1901) und Michel-Durand (1918/19) bestätigen konnte, traf dies für die untersuchten Zucker nicht zu. Zwar soll im Herbst Saccharose in großen Mengen angehäuft werden, aber schon im Oktober wieder verschwinden, um in den Monaten Dezember bis Februar ganz zu fehlen. Dies gilt auch für den „Glucosidzucker". „Glucose" konnte während dieser Zeit nur in sehr geringen Mengen nachgewiesen werden. Preising zieht aus seinen Untersuchungen den Schluß (S. 296), daß die Produkte der Photosynthese während des Winters nicht als Kohlenhydrate deponiert werden. Er denkt an Gerbstoffe oder Fette (S. 297).

Gegen diesen Befund meldete zuerst Steiner (1933, S. 607) Bedenken an, die sich aber nicht durchgesetzt haben (vgl. Wanner 1958, S. 849). Die früheren Untersuchungen auf Zucker, soweit sie mit den verschiedensten „Reduktionsmethoden" durchgeführt wurden, sind nun sowohl quantitativ wie auch besonders qualitativ mit zum Teil erheblichen Fehlern behaftet, worauf schon Pfeffer (1897, I, S. 472) auf-

merksam gemacht hat (vgl. dazu Steiner 1933 und Wanner 1952[1], 1958). Es erschien daher notwendig, die früheren Angaben über den jährlichen Gang der Zucker in Efeu-Blättern mit Hilfe einer modernen Methode zu überprüfen.

Material und Methode

Die zur Untersuchung gelangten Efeu-Blätter stammten von einem größeren einheitlichen Bewuchs einer gegen SO exponierten Mauer im Botanischen Garten. Sie wurden stets um 11.00 Uhr geerntet, um tagesperiodische Schwankungen der zur Untersuchung kommenden Saccharide zu eliminieren.

Das Material wurde in einem 60° C warmen Luftstrom getrocknet und in einer Schlagmühle zu feinem Pulver zermahlen. Vergleichende Untersuchungen mit Blättern, welche vor der Trocknung in siedendem 96%igem Aethanol abgetötet worden waren (vgl. Beloserski und Proskurjakow 1956), zeigten keine meßbaren quantitativen Unterschiede hinsichtlich der untersuchten Zucker gegenüber den im Warmluftstrom getrockneten Kontrollen.

Die Kalt-Extraktion des so erhaltenen Blattpulvers geschah durch Schütteln mit der 10fachen Menge 60%igen Aethanols. Nach eingehenden Vorversuchen ergab sich, daß eine solche Alkoholkonzentration optimale Ergebnisse lieferte. Bei höherer Alkoholkonzentration war die Löslichkeit, insbesondere der höhermolekularen Saccharide, nicht mehr befriedigend; bei Anwendung verdünnteren Aethanols ließ sich auf den Chromatogrammen keine scharfe Trennung der Zucker mehr erreichen (vgl. auch Courtois und Mitarbeiter 1956. Zur Löslichkeit der Zucker in Alkohol vgl. Lippmann 1904, S. 1634 u. 1673).

Nach einer Stunde wurde der Extrakt mit der Zentrifuge geklärt und dekantiert. Der Bodensatz wurde noch zweimal mit der 3fachen Menge 60%igen Aethanols aufgenommen und zentrifugiert. Nach einer solchen Behandlung ließen sich im Rückstand keine freien Zucker mehr nachweisen.

Ein direktes Chromatographieren des so gewonnenen Rohextraktes erwies sich als unzweckmäßig, da keine scharfe Trennung der einzelnen Zucker erreicht werden konnte. Gegen eine Reinigung des Rohextraktes mit Bleiazetat (vgl. z. B. Herissey u. Mitarbeiter 1954) erhoben sich Bedenken. Denn bei der späteren Bleiausfällung mit Schwefelsäure besteht für empfindliche Zucker die Gefahr einer Hydrolyse. Daher wurde eine Reinigung mit Kohle versucht. Neben dem Vorteil, der in der Verwendung relativ geringer Mengen liegt, hat die Kohle den Nachteil, auch Zucker in mehr oder weniger großem Umfang zu adsorbieren (vgl. Rona und Michaelis 1909; Herzog 1909; Clark 1913; Netter 1951). Die Adsorption der Zucker an Kohle ist umso größer, je größer das Zuckermolekül ist. Nun hatten aber Rona und Michaelis (1909) gezeigt, daß man das Adsorptionsvermögen der Kohle gegenüber Zuckern in schwach zuckerhaltigen Flüssigkeiten praktisch auf Null herabdrücken kann, ohne daß dadurch die Adsorption von Eiweißkörpern u. a. an die Kohle beeinflußt würde, wenn man in den

[1] Nach Wanners (1952) Feststellungen können die nach Reduktionsmethoden an Pflanzenextrakten berechneten Zucker gegenüber papierchromatographisch ermittelten Werten bis zu 355% (!) Fehler aufweisen (s. auch Schmidhauser 1955).

Ansatz eine stark oberflächenaktive Substanz, z. B. Aceton, gibt. In einer Versuchsreihe fanden die genannten Autoren bei einem Zusatz von 10% Aceton optimale Ergebnisse. Diese Befunde von Rona und Michaelis konnten in Vergleichsuntersuchungen bestätigt werden (Tabelle 1).

Für die Reinigung der Rohextrakte wurde Clarocarbon F (Merck) unter Zusatz von 10% Aceton zur Zuckerlösung verwendet. Die Testzucker wurden ebenso behandelt.

Schließlich wurden die Extrakte im Vakuum eingeengt, mit Wasser auf 10 ml gebracht, ein bestimmtes Volumen davon sofort auf Schleicher- und Schüll-Papier Nr. 2043b aufgetragen und mit Phenol-Wasser absteigend chromatographiert (Partridge 1946, 1948, 1949). Phenol wurde vor allem deswegen als Lösungsmittel gewählt, weil bei seiner Anwendung die Rf-Werte der höher molekularen Saccharide günstiger liegen als z. B. bei Verwendung von Butanol-Eisessig. Auch ist bei Verwendung von Phenol jede Gefahr einer eventuellen — wenn auch nur geringfügigen — Hydrolyse der Zucker während des Chromatographierens ausgeschlossen.

Tabelle 1

Wiedergefundene Zuckermenge nach Behandlung	Fructose %	Saccharose %	Raffinose %
a) mit Kohle	52,3	31,7	20,6
b) mit Kohle und 10% Aceton im Ansatz	99,4	99,5	98,8

Als Chromatographierkammern dienten Steingutträge mit den Abmessungen 630 mm hoch, 210 mm breit und 360 mm tief, deren oberer Rand plangeschliffen und mit einer Glasscheibe abgedeckt war. Das Lösungsmittel befand sich in Glasschalen, die auf einer ca. 30 mm unter dem Rand der Tröge verlaufenden Steingutleiste auflagen. Die Laufzeit der Chromatogramme betrug 40 Stunden, die vorherige Äquilibrierungszeit 24 Stunden. Ein Extrakt wurde in der Regel in 3 Serien mit je 4 Streifen chromatographiert.

Ein Papierstreifen trug 4 Startpunkte. An 2 Startpunkten wurden abgemessene Volumina von Lösungen der Testzucker bekannter Konzentration aufgetragen, an den beiden anderen je eine abgemessene Menge des betreffenden Extraktes. Das Papier wurde nach dem Chromatographieren und Trocknen in 4 Streifen zerschnitten. Je ein Streifen mit den Testzuckern und mit dem Extrakt wurde entwickelt, und zwar für die Aldosen mit Anilinphthalat (Partridge 1949a) mit anschließender Trocknung bei 105° C während 10 Minuten, für die Ketosen durch Besprühen mit Orcin-Trichloressigsäure (Klevstrand und Nordal 1950; Bevenue und Williams 1951) und anschließender Trocknung bei 105° C während 20 Minuten. Damit war es möglich, zunächst überhaupt die Art der auftretenden Zucker zu erkennen und die bei der quantitativen Bestimmung zu erwartenden Zuckermengen abzuschätzen.

Auf den beiden anderen Streifen des Chromatogramms wurden die die Zucker enthaltenden Partien ausgeschnitten und nach Dent (1947)

mit Wasser eluiert. Die quantitative Bestimmung der Zucker in den Eluaten erfolgte colorimetrisch mit dem Lange-Photometer, und zwar für Ketozucker mit Orcin, für Aldosen mit Anilinphthalat. (Zur quantitativen Auswertung der Eluate vgl. auch Hawthorne 1947; Flood, Hirst und Jones 1947; Hirst und Jones 1949; Wanner 1952a; Cronenberger und Cuzin 1954; Schmidhauser 1955; Pavlinova und Kursanow 1956.)

Als Testzucker standen Raffinose, Saccharose, Fructose, Galaktose und Glucose zur Verfügung. Sie wurden in Reihen von 0, 50, 100, 150, 200, 300 usw. bis 1000 γ unter genau gleichen Bedingungen wie die Extrakte mitbehandelt und entsprechende Eichkurven aufgestellt. Dadurch, daß auf den Chromatogrammen jeweils verschiedene Mengen an Testzucker zur Verwendung kamen, wurden diese Eichkurven stets aufs neue überprüft. Bei jeder Serie wurden auch zuckerfreie Stücke dem Papier nach der Chromatographie entnommen, ebenso eluiert und als Blindwerte colorimetriert.

Tabelle 2

Einwaage 200 mg	Mittelwert aus 12 Messungen	Durchschnittlich wiedergefunden %
Fructose . . .	193,6 ± 6,4	96,8
Saccharose . .	194,4 ± 3,9	97,2
Raffinose . . .	195,8 ± 2,6	97,9
Glucose	202,6 ± 5,3	101,3
Galaktose . . .	191,3 ± 4,5	95,7

Eine Übersicht über die bei einem solchen Verfahren aufgetretenen Fehler gibt die Tabelle 2.

Da Stachyose als Testsubstanz nicht zur Verfügung stand, wurden die nach Lage der Flecken als Stachyose anzusprechenden Stellen (Rf = 0,15) aus 18 Papierstreifen ausgeschnitten, eluiert, hydrolysiert und das Hydrolysat erneut chromatographiert. Es konnte so das Auftreten von Fructose, Glucose und Galaktose im Verhältnis 1:1:2 festgestellt und damit dieser Zucker sicher als Stachyose angesprochen werden. Die quantitativen Angaben über Stachyose sind auf Raffinose bezogen. Der dadurch entstandene Fehler mußte in Kauf genommen werden.

Eine so ausführliche Darstellung der zur Anwendung gelangten Methode schien erforderlich, da schon kleine methodische Abweichungen zu erheblichen Fehlern führen können, eine Tatsache, auf die vor allem Schmidhauser (1955) mit allem Nachdruck aufmerksam macht. (Vgl. im übrigen Bell 1955; Stange 1955 und Cramer 1958.)

Ergebnisse

Bei der Untersuchung des jahreszeitlichen Verlaufs des Gehalts an Zuckern in Efeu-Blättern zeigte sich, daß Fructose, Saccharose, Raffinose, Stachyose, Glucose und Galaktose frei auftraten und mengenmäßig variierten (Tabelle 3).

Tabelle 3. *Jahreszeitlicher Gang einiger Zucker in den Blättern von Hedera helix* L. (in % des Trockengewichts)

Monat	Fructose	Saccharose	Raffinose	Stachyose	Glucose	Galaktose
Januar	4,1	12,6	2,0	2,3	5,4	1,2
Februar	3,8	13,1	2,1	2,7	5,8	1,7
März	3,6	8,4	1,1	0	5,3	Spur
April	3,9	7,7	0	0	5,2	0
Mai	3,8	7,8	0	0	5,4	0
Juni	3,4	7,9	0	0	5,0	0
Juli	3,5	8,2	0	0	4,8	0
August	3,2	8,1	0	0	4,9	0
September . .	3,6	8,6	0	0	5,4	0
Oktober	4,8	10,1	0,6	0	6,5	0,3
November . . .	4,5	11,4	1,4	0,7	6,2	0,5
Dezember . . .	4,2	11,8	1,7	1,3	5,8	0,8

Während des ganzen Jahres herrschte in den Blattextrakten Saccharose bei weitem vor. Vom Mai bis zum September blieb ihre Menge auf ziemlich gleichbleibendem Niveau. Ab September stieg sie stetig an und erreichte im Spätwinter (Februar) ihr Maximum. Die Saccharose war stets von Glucose und Fructose begleitet, jedoch blieben diese mengenmäßig hinter ihr zurück. Deren Konzentration zeigte einen deutlichen Anstieg im Herbst, der zeitlich mit dem der Saccharose einsetzte, jedoch bereits im Oktober sein Maximum erreichte.

Raffinose und Galaktose traten erstmals im Oktober auf. Ihre Menge nahm bis zum Februar stetig zu. Stachyose wurde ab November gebildet; auch ihr Vorkommen erreichte im Februar seinen höchsten Stand.

Während nun die Glucose und Fructose vom Oktober an langsam wieder bis zum Hochsommer auf ihre Ausgangskonzentrationen absanken, zeigten die nichtreduzierenden Oligosaccharide (Saccharose, Raffinose und Stachyose) und die Galaktose vom Februar zum März hin einen plötzlichen Rückgang. Der Rückgang des Raffinosegehaltes hinkte etwas nach; es wurden im März noch merkliche Mengen gefunden, jedoch war auch die Raffinose im April ganz verschwunden.

Für einen Einblick in den Kohlenhydrathaushalt der Pflanze dürfte es bedeutungsvoll sein, die Zuckermengen in Form von Monosaccharideinheiten zu vergleichen. Denn einerseits können die verschiedenen Monosaccharide leicht ineinander umgewandelt werden, andererseits werden aus solchen Monosaccharideinheiten die Oligosaccharide aufgebaut, aus denen sie leicht wieder freigesetzt werden können. Betrachtet man den jahresperiodischen Gang der löslichen Kohlenhydrate, dargestellt in mmol Monosaccharideinheiten pro 100 g Trockensubstanz (Abb. 1), so zeigt sich zunächst, daß der Gesamtzuckerspiegel in den Blättern von *Hedera helix* mit Eintritt der kalten Jahreszeit allmählich

ganz wesentlich erhöht wird (bis um ca. 80%). An dieser Erhöhung sind Glucose und Fructose nur im Herbst, die übrigen Zucker während der gesamten Winterperiode beteiligt.

Die Gesamtmenge der Monosaccharide ist während des ganzen Winters (Oktober bis Februar) durch das Hinzukommen steigender Mengen an Galaktose ziemlich gleichbleibend um ca. 20% erhöht (Abb. 2). Am Aufbau des winterlichen Maximums der Oligosaccharide sind vorwiegend Saccharose, daneben noch Raffinose und Stachyose beteiligt.

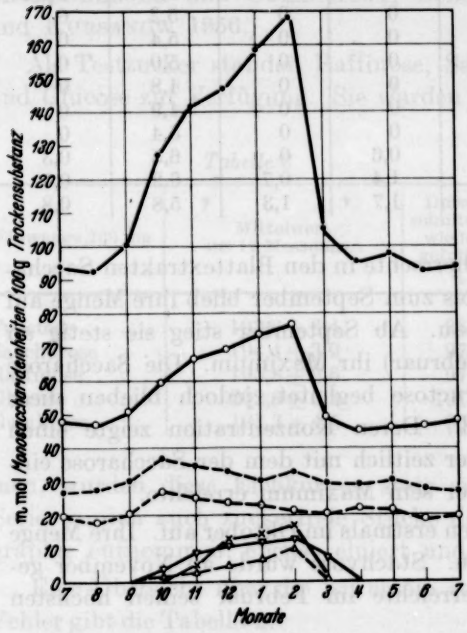


Abb. 1. Jahresperiodischer Gang der löslichen Kohlenhydrate in den Blättern von *Hedera helix* (in mmol Monosaccharideinheiten/100 g Trockensubstanz). ●——● Gesamtzucker; ○——○ Saccharose; ▽——▽ Raffinose; ×——× Stachyose; ●– – –● Glucose; ○– – –○ Fructose; △– –△ Galaktose.

Was nun schließlich das Verhältnis Mono- : Oligosaccharide anbetrifft, so zeigt sich (Abb. 3), daß nur im Herbst (September bis Oktober) und im Frühjahr (April bis Juni) die Monosaccharide überwiegen; im Sommer und vor allem im Winter herrschen die Oligosaccharide in den Blattextrakten vor.

Diese Befunde bestätigen diejenigen von MICHEL-DURAND (1918/19), der in Efeu-Blättern ebenfalls ein Maximum der nichtreduzierenden Zucker im Winter fand. Sie stehen aber im Gegensatz zu denen von PREISING (1930), der zwar von einem herbstlichen Anstieg der reduzierenden Zucker und der Saccharose berichtete, aber in den eigentlichen Wintermonaten nur Spuren reduzierender Zucker und keine Saccharose fand. Die Bedenken, die STEINER (1933) gegen die Befunde von PREISING (1930) vorgebracht hat, sind also durchaus berechtigt. Ebenso ließen neuere Ergebnisse an Blättern von Raps und Rübsen (HELLSTRÖM 1956) im Herbst ein Überwiegen der Monosaccharide, im Hoch- und Spätwinter ein solches der Oligosaccharide deutlich erkennen. Das Verhalten der Zucker in Efeu-Blättern zeigt somit keine Abweichungen gegenüber dem Verhalten der Zucker in den Blättern von Raps und Rübsen. Es erhöht sich also nicht nur der Gesamtzuckerspiegel mit Eintritt der kalten Jahreszeit, sondern es tritt

auch das unterschiedliche Verhalten der Mono- und Oligosaccharide deutlich in Erscheinung.

Mit einem winterlichen Ansteigen des Gesamtzuckerspiegels ist ein Absinken des Stärkegehalts gekoppelt, wie LIDFORSS (1896, 1907), CZAPEK (1901), MICHEL-DURAND (1918/19) u. a. nachgewiesen haben.

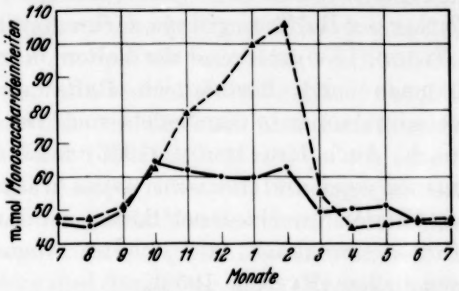


Abb. 2. Monosaccharide und Oligosaccharide (in mmol Monosaccharideinheiten). ●——● Monosaccharide; ▲– –▲ Oligosaccharide

Wahrscheinlich wird also zumindest ein Teil der Stärke mit Eintritt der kalten Jahreszeit in die erwähnten Zucker umgewandelt (weitere Literatur bei LEVITT 1956). Der in Efeu-Blättern festgestellte Anstieg des Lipoidgehalts während der Herbstmonate (ZIRM, PONGRATZ und

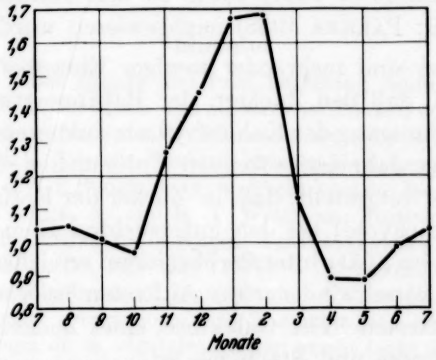


Abb. 3. Verhältnis Monosaccharide:Oligosaccharide (in mmol Monosaccharideinheiten)

POLESOFSKY 1956) dürfte ebenfalls auf Kosten der Stärke gehen. Da Ausmaß der Stärkeumwandlungen wird jedoch durch die auch während des Winters mehr oder weniger intensiv weiterlaufende Photosynthese unübersichtlich. Nach ANDERSSON (1944) soll der im Winter photosynthetisch neu gebildete Zucker nicht mehr zu Stärke kondensiert werden, sondern in niedermolekularer Form liegen bleiben.

Die Untersuchungen von LIDFORSS (1896, 1907), CZAPEK (1901), MICHEL-DURAND (1918/19), PREISING (1930) u. a. haben sich lediglich

auf die Feststellung von reduzierenden Zuckern und von Rohrzucker beschränkt. Mit der Einführung papierchromatographischer Nachweismethoden ist es ohne Schwierigkeiten möglich geworden, die Art der auftretenden Zucker genauer zu spezifizieren. Inzwischen wurden bei vielen Pflanzen neben der Saccharose noch andere nichtreduzierende Oligosaccharide festgestellt, und es ist bemerkenswert, daß sich gerade im Winter[1] oft Zucker der Raffinosegruppe nachweisen lassen. So fanden Bradfield und Flood (1950) während der kalten Jahreszeit in Trieben von Apfel-, Pflaumen- und Birnbäumen Raffinose und Stachyose. Parker (1957) wies im Januar in den Nadeln von *Pinus ponderosa* ebenfalls Raffinose nach. Auch Hellström (1956) fand in Blättern und Wurzeln von *Brassica rapa* und *Brassica napus* während des Winters Raffinose. In den Rinden verschiedener Bäume ist im Dezember Stachyose und Raffinose vorhanden, die sich im August höchstens in Spuren nachweisen ließen (Parker 1958).

Das Auftreten der Saccharide der Raffinosegruppe (vgl. French 1954) in z. T. beachtlichen Mengen verdient besonderes Interesse. Bisher sind solche Saccharide — abgesehen von den oben angeführten Fällen — in größerem Umfang eigentlich nur in Samen (Übersicht bei Duperon 1955), in wenigen unterirdischen Pflanzenteilen (vgl. Piault 1910; Cheymol 1937; Courtois und Mitarbeiter 1956) und im Siebröhrensaft (Zimmermann 1957) sowie in den Rinden einiger Bäume (Vintilesco 1909; Parker 1958) nachgewiesen worden.

Alle Nachweise sind mehr oder weniger Einzelbefunde, die jedoch darauf hindeuten, daß den Zuckern der Raffinosegruppe eine gewisse Bedeutung im Jahresgang der Kohlenhydrate zukommen dürfte. Unsere sich auf ein ganzes Jahr erstreckenden Untersuchungen haben dies bestätigt. Es wurde festgestellt, daß die Zucker der Raffinosegruppe (hier Raffinose und Stachyose) bei den untersuchten Efeu-Blättern erst im Herbst auftreten, im Spätwinter ihr Maximum erreichen und im zeitigen Frühjahr wieder verschwinden. Ihr Auftreten ist verknüpft mit dem gleichzeitigen Auftreten freier Galaktose, eines Zuckers, der eine Komponente der Raffinose und Stachyose ist.

Es zeigt sich, wie wichtig es bei Untersuchungen des Zuckerhaushalts ist, diese nicht nur auf die reduzierenden Zucker und die Saccharose zu beschränken, sondern auch auf die Zucker der Raffinosegruppe auszudehnen, deren Auftreten und deren Jahresgang bei vielen Pflanzen offenbar von allgemeiner Bedeutung sein dürfte. So läßt sich vielleicht ein tieferer Einblick in die Vorgänge der Zuckerspeicherung und die Fragen der Zuckertransformation bei Pflanzen gewinnen.

[1] Die Notwendigkeit, den Erntetermin bei Analysen von pflanzlichem Material anzugeben, wird hier erneut deutlich.

Zusammenfassung

1. In Blättern von *Hedera helix* wurde papierchromatographisch das Vorkommen von freier Glucose, Galaktose, Fructose, Saccharose, Raffinose und Stachyose festgestellt und der Jahresgang dieser Zucker verfolgt.

2. Während des ganzen Jahres herrscht mengenmäßig die Saccharose vor, zeigt jedoch während der kalten Jahreszeit eine deutliche Zunahme mit einem Maximum im Spätwinter. Galaktose, Raffinose und Stachyose treten nur im Winter auf, und ihr Gehalt erreicht ebenfalls im Spätwinter sein Maximum. Auch die Glucose- und Fructose-Mengen zeigen im Herbst einen deutlichen Anstieg, auf den jedoch schon vom November an ein allmähliches Absinken bis zum Hochsommer hin folgt.

3. Die Gesamtmenge der Monosaccharide ist während des Winters (Oktober—Februar) ziemlich gleichbleibend um ca. 20% erhöht. Zu Anfang des Winters sind daran vor allem Glucose und Fructose beteiligt, gegen Ende des Winters tritt Galaktose anteilmäßig stärker hervor.

4. In Efeu-Blättern tritt somit ein ausgesprochenes winterliches Zuckermaximum auf, das überwiegend auf nichtreduzierende Oligosaccharide zurückzuführen ist.

Herrn Professor Dr. A. Arnold danke ich für Anregungen, die sich aus manchen Diskussionen ergaben. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sowie der Vereinigung von Freunden der Techn. Hochschule Stuttgart bin ich für Sachbeihilfen zu Dank verpflichtet.

Literatur

Andersson, G.: Gas change and frost hardening studies in winter cereals. Lund 1944. — Bell, D. J.: Mono- and oligosaccharides and acidic monosaccharide derivates. Aus: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, Bd. 2, S. 1—54. Herausgeg. von K. Paech u. M. V. Tracey. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955. — Beloserski, A. N., u. N. I. Proskurjakow: Praktikum der Biochemie der Pflanzen. Berlin 1956. — Bevenue, A., and K. T. Williams: Further evidence indicating the specificity of the orcinol spray reagent for ketoheptoses on paper chromatograms. Arch. Biochem. **34**, 225—227 (1951). — Bradfield, A. E., and A. E. Flood: Soluble carbohydrates of fruit plants. Nature (Lond.) **166**, 264—265 (1950). — Cheymol, J.: Variations dans la composition glucidique du *Verbena officinalis* L. ou cours de la végétation d'une année (août 1935 — juillet 1936). Bull. Soc. Chim. biol. (Paris) **19**, 1626—1646 (1937). — Clark, W. B.: The action of animal charcoal on cane sugar solutions. J. Soc. chem. Ind. (Lond.) **32**, 262—265 (1913). — Courtois, J. E., A. Archambault et P. LeDizet: Identification du verbascose dans divers végétaux. Bull. Soc. Chim. biol. (Paris) **38**, 351—358 (1956). — Cramer, F.: Papierchromatographie, 4. Aufl. Weinheim 1958. — Cronenberger, L., et L. G. Cuzin: Analyse quantitative des sucres contenus dans les mélasses de Betteraves par chromatographie de partage sur papier. Bull. Sté. Chim. Biol. (Paris) **36**, 715—717 (1954). — Czapek, F.: Der Kohlenhydrat-Stoffwechsel der Laubblätter im Winter. Ber. dtsch. bot. Ges. **19**, 120—127 (1901). — Biochemie der Pflanzen, 2. Aufl., Bd. 1. Jena 1913. — Dent, C. E.: The aminoaciduria in Fanconi syndrome. A study making extensive use of techniques based on paper partition chromatography. Biochem. J. **41**, 240—253 (1947). — Dupe-

ron, R.: Répartition, formation et utilisation du raffinose et stachyose dans les graines. C. R. Acad. Sci. (Paris) **241**, 1817—1819 (1955). — Flood, A. E., E. L. Hirst and J. K. N. Jones: Quantitative estimation of mixtures of sugars by the paper chromatogram method. Nature (Lond.) **160**, 86—87 (1947). — French, D.: The raffinose family of oligosaccharides. Advanc. Carbohyd. Chem. **9**, 149—184 (1954). — Guttenberg, H. v.: F. A. Preisings Untersuchungen über den Kohlenhydratstoffwechsel immergrüner Blätter im Laufe eines Jahres. Planta (Berl.) **6**, 801—808 (1928). — Hawthorne, J. R.: Micro-estimation of sugars separated on the filter paper chromatogram. Nature (Lond.) **160**, 714—715 (1947). — Hellström, N.: Investigations on oil turnips and oil rape. VI. Further investigations in chemical composition. Acta agric. scand. **6**, 17—44 (1956). — Herissey, H., P. Fleury, A. Wickstrom, J. E. Courtois et P. LeDizet: Isolement de cinq galactosides du saccharose des racines de Bouillon blanc. Bull. Sté. Chim. Biol. (Paris) **36**, 1507—1518 (1954). — Herzog, R. O.: Über die Adsorption von Zuckerarten durch Tierkohle. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **60**, 79—84 (1909). — Hirst, E. L., and J. K. N. Jones: Quantitative analysis of mixture of sugars by the method of partition chromatography. III. J. chem. Soc. (Lond.) **1949**, 1659. — Klevstrand, R., and A. Nordal: A spraying reagent for paper chromatograms which is apparently specific for ketoheptoses. Acta chem. scand. **4**, 1320 (1950). — Levitt, J.: The hardiness of plants. Agronomy VI. New York 1956. — Lidforss, B.: Zur Physiologie und Biologie der wintergrünen Flora. Bot. Zbl. **68**, 33 bis 44 (1896). — Die wintergrüne Flora. Lunds Univ. Årsskr., N. F. Avd. 2 **2**, 1—78 (1907). — Lippmann, E. O. v.: Die Chemie der Zuckerarten, 3. Aufl. Braunschweig 1904. — Mer, E.: De la constitution et des fonctions des feuilles hivernales. Bull. Soc. bot. France **23**, 231—238 (1876). — Michel-Durand, E.: Variation des substances hydrocarbonées dans les feuilles. Rev. gén. Bot. **30**, 337—345, 377—382 (1918); **31**, 143—156, 196—204, 251—268, 287—317 (1919). — Netter, H.: Biologische Physikochemie. Potsdam 1951. — Parker, J.: Seasonal changes in some chemical and physical properties of living cells of *Pinus ponderosa* and their relation to freezing resistance. Protoplasma (Wien) **48**, 148—163 (1957). — Changes in sugars and nitrogenous compounds of tree barks from summer to winter. Naturwissenschaften **45**, 139 (1958). — Partridge, S. M.: Application of the paper partition chromatogram to the qualitative analysis of reducing sugars. Nature (Lond.) **158**, 270—271 (1946). — Filter-paper partition chromatography of sugars. Biochem. J. **42**, 238—241 (1948). — Partition chromatography and its applications to carbohydrate studies. Biochem. Soc. Symposia **3**, 52—61 (1949). — Anilin hydrogen phthalate as a spraying reagent for chromatography of sugars. Nature (Lond.) **164**, 443 (1949a). — Pavlinova, O. A., and A. L. Kursanow: On the participation of invertase of higher plants in the formation of oligosaccharides. Fiziol. Rastenij. **3**, 539—546 (1956) [Russisch mit engl. Zus.fass., Suppl. S. 5]. — Pfeffer, W.: Pflanzenphysiologie, 2. Aufl., Bd. 1. Leipzig 1897. — Piault, M. L.: Sur la présence du stachyose dans les parties souterraines de quelques plantes de la famille des Labiées. J. Pharm. Chim. (Paris) Sér. VII **1**, 248—255 (1910). — Preising, F. A.: Untersuchungen über den Kohlenhydratstoffwechsel des immergrünen Laubblattes im Laufe eines Jahres. Bot. Archiv **30**, 241—306 (1930). — Rona, P., u. L. Michaelis: Über die Adsorption des Zuckers. Biochem. Z. **16**, 489 bis 498 (1909). — Schmidhauser, Th.: Natur und Verteilung der löslichen Kohlenhydrate im ruhenden und keimenden Gerstenkorn. Ber. schweiz. bot. Ges. **65**, 302—342 (1955). — Schulz, E.: Über Reservestoffe in immergrünen Blättern unter besonderer Berücksichtigung des Gerbstoffes. Flora (Jena) **71**, 223—241, 248—258 (1888). — Stange, L.: Kohlenhydrate. Aus: Papierchromatographie in der Botanik, S. 54—82. Herausgeg. von H. F. Linskens. Berlin-Göttingen-

Heidelberg: Springer 1955. — STEINER, M.: Zum Chemismus der osmotischen Jahresschwankungen einiger immergrüner Holzgewächse. Jb. wiss. Bot. **78**, 564 bis 622 (1933). — VINTILESCO, J.: Sur la présence du "stachyose" dans le jasmin blanc (*Jasminum officinale* L.). J. Pharm. Chim. (Paris), Sér. VI **29**, 336—339 (1909). — WANNER, H.: Über die Genauigkeit quantitativer Zuckerbestimmungen in Pflanzenextrakten. Helv. chim. Acta **35**, 460—464 (1952). — Natur und Verteilung der löslichen Kohlenhydrate im Erbsenkeimling. 2. Mitt.: Qualitative und quantitative Bestimmung der einfachen Zucker durch Papierchromatographie. Ber. schweiz. bot. Ges. **62**, 205—217 (1952a). — Die Speicherung von Kohlenhydraten im Blatt. Aus: Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. 6, S. 841—854. Herausgeg. von W. RUHLAND u. a. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1958. — ZIMMERMANN, M. H.: Translocation of organic substances in trees. I. The nature of the sugars in the sieve tube exudate of trees. Plant Physiol. **32**, 288—291 (1957). — ZIRM, K. L., A. PONGRATZ u. W. POLESOFSKY: Zur Frage der Winterhärte von Pflanzen. Z. Naturforsch. **11b**, 110—113 (1956).

Dr. K. JEREMIAS, Botanisches Institut der Technischen Hochschule Stuttgart

Planta, Bd. 52, S. 206—229 (1958)

Aus dem Botanischen Institut der Universität Mainz

UNTERSUCHUNGEN ZUR STADIENSPEZIFITÄT DES TERATOGENEN EFFEKTES DER 2,4-DICHLORPHENOXYESSIGSÄURE BEI GALIUM APARINE

Von

BARBARA HACCIUS und WERNER SCHNEIDER*

Mit 12 Textabbildungen

(Eingegangen am 4. Juni 1958)

Einleitung

P. W. ZIMMERMANN hat bereits 1942 in seinem Bericht über die „formativen Wirkungen von Wuchsstoffen auf Pflanzen" *die charakteristische Folge verschiedenartig veränderter Blätter nach einmaliger Wirkstoffapplikation* beschrieben und abgebildet. Danach treten an Pflanzen mit normalerweise fiederteiligen Blattorganen nach Behandlung mit gewissen ringsubstituierten Phenoxyfettsäuren und Benzoesäuren regelmäßig zuerst Fiederverschmälerungen und darauf folgend Fiederverwachsungen auf. Das gleiche Phänomen wurde in der Folgezeit von verschiedenen Autoren an weiteren Pflanzenarten beobachtet und beschrieben. Man vergleiche unter anderen HANF (1951 u. 1957), LINSER, FROHNER und KIRSCHNER (1953 u. 1955) und FURUYA und OSAKI (1955).

Neuerdings haben LINSER und KIRSCHNER (1957) eine eingehende Analyse der morphogenetischen Wirkung der 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) bei *Erodium cicutarium* veröffentlicht. In 2 umfangreichen Versuchsreihen wurde das jeweilige Entwicklungsstadium der Blattanlagen zur Zeit der 2,4-D-Behandlung durch Präparation und Trockengewichtsbestimmung ermittelt und mit den an Blättern gleicher Ordnungszahl auftretenden Anomalien in Zusammenhang gebracht. Auf diese Weise konnte eine direkte Beziehung zwischen dem Differenzierungsgrad der durch die 2,4-D-Applikation betroffenen Blattanlage und der Art und Weise der aberranten Weiterentwicklung bewiesen werden.

Auf Grund der Ergebnisse der zoologischen Entwicklungsphysiologie wissen wir, daß bei allen experimentell induzierten morphoregulatorischen Prozessen an tierischen Embryonen jeder einzelnen Morphose eine mehr oder weniger eng begrenzte Entwicklungsphase zugeordnet ist, in welcher sich das betreffende Organ beim Wirksamwerden des Einflusses befunden haben muß. Sicher gilt das gleiche auch für pflanzliche Keime und Vegetationspunkte.

* D 77.

Während die desorganisierende Wirkung der 2,4-D auf die einzelnen Gewebe höherer Pflanzen Gegenstand zahlreicher Arbeiten ist, gibt es unseres Wissens kaum genauere anatomische Untersuchungen über Ausgangsstadium und Entwicklungsgeschichte experimentell induzierter Aberrationen ganzer Organe. Das hat verschiedene Gründe.

Im allgemeinen treten typische Gestalt-Anomalien nur sporadisch auf und werden daher erst in voll ausgebildetem Zustand beobachtet. Eine Untersuchung der Entstehungsweise ist dann natürlich nicht mehr möglich. Wie jedoch unter anderen die Untersuchungen von Linser und Kirschner wieder bewiesen haben, liegt hierin kein unüberwindliches Hindernis. Bei der Wahl eines geeigneten Objektes und geeigneter Versuchsbedingungen kann man durch 2,4-D-Behandlung bestimmte Bildungsabweichungen mit ziemlicher Sicherheit immer wieder erhalten.

Eine weitere Schwierigkeit, vor allem für die Festlegung des für die jeweilige Teratogenese sensiblen Ausgangsstadiums, ergibt sich aus der Tatsache, daß man für die Wirksamkeit der applizierten Substanz eine je nach Pflanzenart und Milieubedingungen verschieden lange Dauer annehmen muß. Es ist aber nicht möglich, die für eine bestimmte morphogenetische Wirkung sensible Phase eines Primordiums genau abzugrenzen, wenn der Einfluß des Wirkstoffes auf die Zellen des Vegetationspunktes auch nur über mehrere Tage hin erhalten bleibt (vgl. Haccius 1956).

Wir haben in den Sämlingen des allgemein als „2,4-D-resistent" geltenden Klettenlabkrautes *(Galium aparine)* ein Objekt gefunden, das die Forderung nach einer möglichst kurzfristigen 2,4-D-Wirksamkeit in besonderem Maß erfüllt. Wir beobachteten, daß die 2,4-D-Behandlung eines zeitlich sehr eng begrenzten und daher genau zu definierenden Entwicklungsstadiums der Keimpflanze regelmäßig zur Ausbildung urnenförmiger Blattverwachsungen im 3. oder 4. epikotylen Blattwirtel führt, während ein bis zwei Tage ältere Pflänzchen nicht mehr in diesem Sinne reagieren. So war es möglich, die für derartige Mißbildungen sensible Phase des Sproßvegetationspunktes anatomisch genau festzulegen und die Entwicklungsgeschichte der Blatt-Verwachsungen von Beginn an zu verfolgen.

Hauptteil

I. Beschreibung der nach 2,4-D-Behandlung verschieden alter Galium aparine-Keimpflanzen auftretenden Blattanomalien

1. Morphologie der unbehandelten Keimpflanzen. *Galium aparine* gehört zu den *Galium*-Arten mit variabler Wirtelzähligkeit. Während bei dem ersten epikotylen Blattwirtel die 4-Zahl relativ häufig vorkommt, überwiegen bei den folgenden Wirteln die 5- und 6-Zahl (Abb. 1 I).

Zwei- oder dreigliedrige Wirtel wurden an den 200 daraufhin näher untersuchten Kontrollpflanzen in keinem Fall gefunden.

Bekanntlich wird in der morphologisch-systematischen Literatur die auf DECANDOLLE (1827, S. 339) zurückgehende Ansicht vertreten, daß es sich bei den Blattwirteln der stellaten Rubiaceen nicht eigentlich um aus morphologisch gleichwertigen Organen zusammengesetzte mehrgliedrige, sondern in Wirklichkeit um zweizählige Wirtel handelt, die durch den Hauptblättern gleichgestaltete „interpetiolare Nebenblätter" verstärkt sind.

Nach FRANKE (1896), der bei verschiedenen *Galium*- und *Asperula*-Arten die Entwicklungsgeschichte der Blattwirtel näher untersucht hat, werden die Primordien der Hauptblätter stets *vor* denjenigen der Nebenblätter angelegt. Durch „nach beiden Seiten von den Hauptanlagen fortschreitende Ausbreitung des Grundes" dieser beiden Primordien werde ein „Ringwall" gebildet, auf welchem die „Stipeln" in Ein- oder Mehrzahl „von den Hauptblättern aus nach beiden Seiten in fortschreitender Folge" angelegt werden.

Auf Querschnitten ist die Lage der Hauptblätter leicht auszumachen, da nur sie die Anlage einer Achselknospe aufweisen. Die Innervierung der sogenannten Nebenblätter erfolgt durch Abzweigungen der Mittelnerven der Hauptblätter.

Wir können auf Grund unserer Untersuchungen die Angaben FRANKES bestätigen, möchten jedoch bezüglich der morphologischen Deutung mit TROLL (unveröffentlicht) zu bedenken geben, ob man nicht lieber, anstatt von Stipeln, von Seitenfiedern der beiden gamophyllen Hauptblätter sprechen sollte. Die von FRANKE geschilderte Anlegungsfolge würde in diese Richtung weisen. Wieweit der Vergleich mit den typischen Interpetiolarstipeln in anderen Verwandtschaftskreisen der Rubiaceen (vgl. TROLL 1939, S. 1273) als Argument für die übliche Auffassung herangezogen werden kann, bleibt noch nachzuprüfen.

Im Folgenden werden wir bei *Galium aparine*, da wo eine Unterscheidung nötig ist, von den Haupt- und Nebenblättern der Wirtel sprechen, ohne damit Endgültiges über die morphologische Deutung aussagen zu wollen. Bei Angaben über die Gliederzahl eines Wirtels werden wir einfachheitshalber, wenn auch nicht ganz korrekt, die sogenannten Nebenblätter als Blätter zählen.

2. Beschreibung der auf verschiedenen Entwicklungsstadien behandelten Keimpflanzen. *a) Material und Methoden.* Im Sommer 1956 beobachteten wir zum ersten Mal abnorm gestaltete *Galium*-Pflänzchen in mit 2,4-D-Lösungen (125 bis 500 ppm) besprühten Aussaat-Töpfen. Die derart veränderten Keimlinge wiesen in der Mehrzahl eine ganz bestimmte, sehr charakteristische Blattfolge auf (Abb. 1 III und Abb. 5 I).

Während die Blätter des ersten auf die Kotyledonen folgenden Wirtels gegenüber denjenigen der unbehandelten Pflanzen stark verschmälert und die des zweiten normal ausgebildet waren, war der dritte Wirtel zu einem mehr oder weniger weit geschlossenen urnenförmigen Gebilde verwachsen (Abb. 1 II und Abb. 2 I—IV).

Da diese Blatt-Tüten in Töpfen mit nur wenige Tage älteren Pflänzchen nach gleichzeitiger und gleichartiger Behandlung fast oder ganz fehlten, haben wir in der Folgezeit systematisch Versuche durchgeführt,

Abb. 1. Unbehandelte (I) und auf einem sehr frühen Entwicklungsstadium behandelte (II u. III) Keimpflanzen von *Galium aparine*

um das für die Induktion von derartigen Blattverwachsungen sensible Entwicklungsstadium des Sproßvegetationspunktes genau abgrenzen zu können.

Hierzu wurden in mehreren Versuchsreihen die Sämlinge der einzelnen Schalen sorgfältig auf möglichst gleiche Entwicklungshöhe hin ausgelesen. Pflänzchen, deren Kotyledonen noch nicht voll entfaltet waren, wurden als zu jung und solche, deren Plumula sich bereits über das Niveau der waagrecht abstehenden Kotyledonarspreiten hinaus erhob, wurden als zu alt verworfen. Innerhalb des übrigbleibenden Versuchsmaterials wurden nochmals folgende drei Entwicklungsstadien unterschieden:

Stadium I: Die Plumula steckt noch zwischen den fest zusammenschließenden Kotyledonen (Abb. 3 I).

Stadium II: Die Plumula ist bereits zwischen den auseinanderweichenden Kotyledonarstielen sichtbar, hat aber deren Länge noch nicht erreicht (Abb. 3 II).

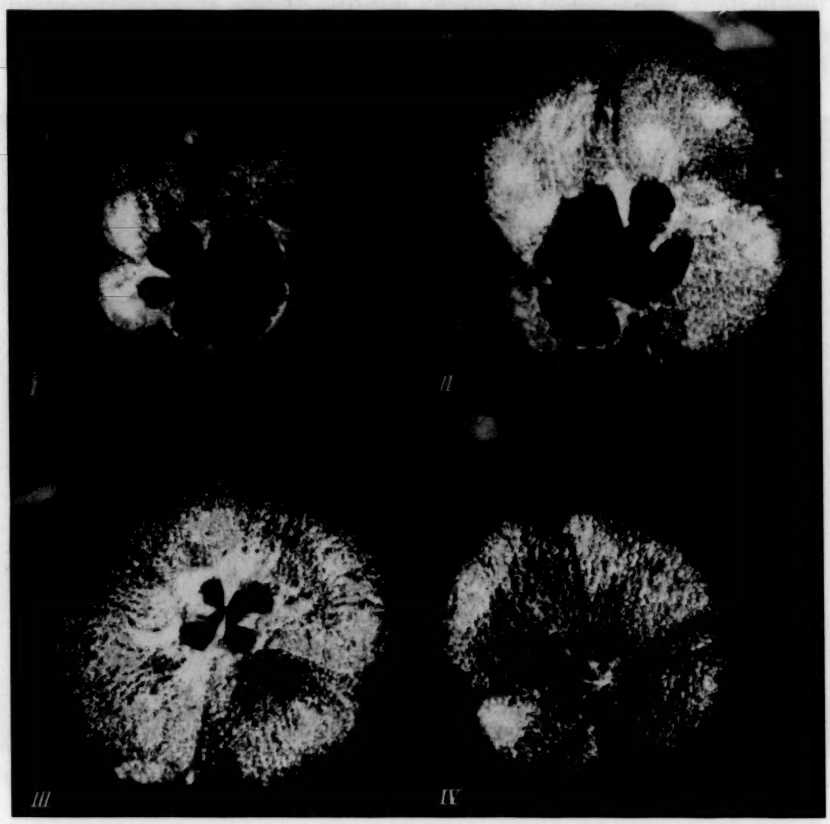


Abb. 2. I—IV verschieden weit verwachsene Blattwirtel bei *G. aparine* nach 2,4-D-Behandlung

Stadium III: Die Gesamtlänge der Plumula entspricht derjenigen der Kotyledonarstiele (Abb. 3 III).

Wenn im Folgenden von „Keimpflanzen des ersten, zweiten oder dritten Stadiums" die Rede ist, dann ist damit immer der Entwicklungszustand zur Zeit der 2,4-D-Applikation gemeint.

Die Behandlung erfolgte durch Besprühen der derart vorbereiteten Aussaatschalen. Als für den Effekt optimale Konzentration hatte sich eine 250 ppm-Lösung des Ammoniumsalzes der 2,4-D erwiesen.

Am Behandlungstag und an jedem der folgenden Tage wurden von jeder der 3 Gruppen Probanden entnommen und in einem Gemisch von 70%igem Äthyl-

alkohol, Formalin und Propionsäure (18:1:1) fixiert. Von dem fixierten Material wurden nach der üblichen Methode Paraffinschnitte hergestellt (Färbung mit Hämatoxylin nach DELAFIELD).

An den Primärachsen waren 7 Tage nach der Behandlung die ersten äußerlich sichtbaren Veränderungen in Form von Blattverschmälerungen im ersten epikotylen Wirtel zu bemerken. Nach 14 Tagen wurden die z. T. zu Tüten verwachsenen Blätter des dritten Wirtels sichtbar.

Bei der abschließenden Bonitierung nach etwa 8 Wochen wurden die Längen der Haupt- und Seitentriebe sämtlicher Pflanzen gemessen, die Anzahl und Zähligkeit der bis dahin ausgebildeten Wirtel bestimmt und das Vorkommen von Bildungsabweichungen registriert. Da die behandelten Pflanzen gegenüber den Kontrollen nicht oder nur unerheblich im Gesamtwachstum zurückgeblieben waren, sind in den im Folgenden zu besprechenden Tabellen die Ergebnisse der Längenmessungen und Blattzählungen nicht verzeichnet.

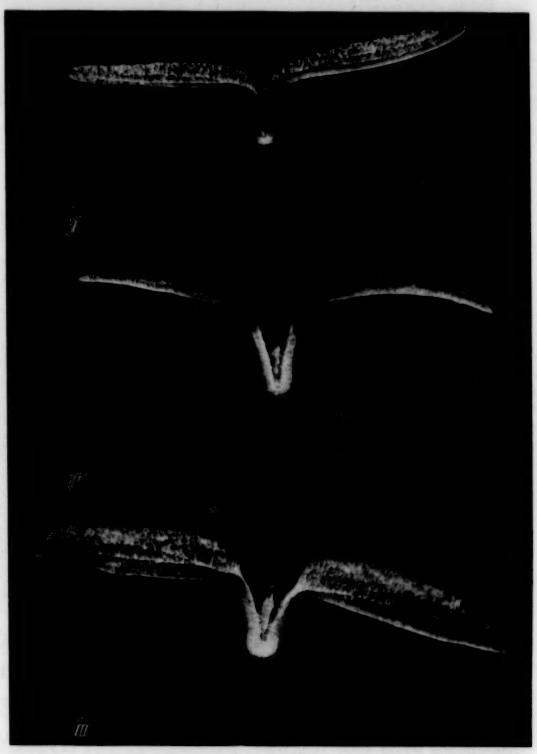


Abb. 3. I—III verschieden weit entwickelte Keimpflanzen von *G. aparine* zum Zeitpunkt der 2,4-D-Behandlung (Behandlungsstadien I—III)

b) Ergebnisse. In Tabelle 1 ist das Ergebnis eines im September 1957 mit im Sommer des gleichen Jahres gesammelten Samen durchgeführten Versuchs zusammengefaßt. Während 84% der behandelten Pflänzchen des ersten Stadiums in der Folgezeit Anomalien in der Beblätterung der Primärachse entwickelten, waren es bei den Probanden des 3. Stadiums nur mehr 20%. An noch etwas älteren Sämlingen waren mit der gleichen Behandlung überhaupt keine Veränderungen mehr zu erzielen.

Wie ebenfalls aus Tabelle 1 hervorgeht, verhielten sich die Achseltriebe der Kotyledonen insofern anders, als der Prozentsatz an Mißbildungen vom 1. bis zum 3. Stadium etwa gleich blieb. Dieser Unterschied beruht darauf, daß die Kotyledonarknospen die zu Beginn der

Keimblattentfaltung erreichte Entwicklungshöhe während der Weiterentwicklung der Primärachse vom Stadium I zum Stadium II beibehalten (Abb. 11 I und II). Keimpflanzen, die zur Behandlungszeit bereits das Stadium III überschritten hatten, entwickelten auch an den Kotyledonartrieben zunehmend weniger Anomalien, so daß prinzipiell kein Unterschied zum Verhalten der Hauptachse besteht.

Literaturangaben darüber, daß *Galium aparine* vom Keimlings-Stadium an vollkommen 2,4-D-resistent sei (ÅBERG 1949, HANF 1950, LINSER u. Mitarb. 1953 und O. SCHMIDT 1954) beziehen sich offensichtlich auf Versuche mit älteren Pflänzchen, die zwar noch Kotyledonen besitzen, aber doch schon über das hier definierte Stadium III hinaus sind. GAVAUDAN und DEBRAUX (1952) nennen in einer (zu Unrecht kaum beachteten) Studie *Galium aparine* in der Liste der Pflanzen, bei welchen Gamophyllie durch 2,4-D-Behandlung der Samen induziert werden kann.

Tabelle 1. *Das Vorkommen von Anomalien an Haupt- und Kotyledonartrieben nach 2,4-D-Behandlung verschieden weit entwickelter Keimpflanzen von Galium aparine*

Behandlungsstadium	Untersuchte Haupttriebe		Untersuchte Kotyledonartriebe	
	Gesamtzahl	davon anomal ausgebildet %	Gesamtzahl	davon anomal ausgebildet %
I	113	84	188	80
II	148	40	283	70
III	51	20	97	70

Eine genauere Analyse der 2,4-D-beeinflußten Keimpflanzen unserer Versuche ließ erkennen, daß 4 verschiedene Blattmorphosen zu unterscheiden sind.

1. Reduktion der Blattspreiten (= Blattverschmälerung) (Abb. 1 III). Es handelt sich hier um eine häufig beschriebene Mißbildung nach 2,4-D-Behandlung (vgl. HANF 1957). Streifen-, Band- oder Riemenblättrigkeit sind nur verschiedene Bezeichnungen für die gleiche Erscheinung, daß nämlich das Spreitenwachstum unter dem Einfluß exo- oder endogener Noxen selektiv geschädigt wurde. Neben den morphoregulatorisch wirksamen Auxinen können auch Viren oder genetische Störungen Schmalblättrigkeit hervorrufen.

2. Umbildung ganzer Wirtel zu mehr oder weniger weit geschlossenen Blatt-Tüten (Abb. 2 I—IV). Auch hierbei handelt es sich um eine der bekannten und häufig beschriebenen typischen Wuchsstoff-Morphosen (vgl. u. a. HACCIUS 1955b).

3. Neben den vollkommen gamophyllen Blatt-Tüten gab es auch *Wirtel mit teils verwachsenen, teils frei entwickelten Blättern* (Abb. 4 I). Man konnte alle Übergänge beobachten von einseitig offenen, aber sonst typischen „Tüten", bis zu fast normal aussehenden Wirteln, bei denen nur ein Blatt durch das Vorhandensein zweier Hauptadern Doppelnatur erkennen ließ.

4. Reduktion der Blattzahl eines oder mehrerer Wirtel (Abb. 4 II) wurde, wie noch näher auszuführen sein wird, vor allem an den Kotyledonartrieben gefunden. Während die Kontrollpflanzen niemals Wirtel

mit weniger als 4 Blättern ausbildeten, waren zwei- oder dreigliedrige Wirtel an den behandelten Pflanzen relativ häufig. Daß es sich hierbei um den mehr oder weniger weitgehenden Ablast der Nebenblätter handelt, ist daran zu erkennen, daß immer die beiden Achselknospen tragenden Blattorgane voll ausgebildet sind (Abb. 10 I u. II).

Abb. 4. Keimpflanzen von *G. aparine* 3 Wochen nach der 2,4-D-Behandlung. I teilweise verwachsener 3. Blattwirtel; II reduzierter Blattwirtel, nur die beiden Hauptblätter sind ausgebildet; III vollständig verwachsener 3. und dreigliedriger 4. Wirtel

In den Tabellen 2 bis 4 ist das prozentuale Vorkommen der verschiedenen Bildungsabweichungen für die Keimpflanzen der drei Stadien zusammengestellt.

Tabelle 2. *Das Vorkommen von Blattverschmälerungen an Haupt- und Kotyledonartrieben 2,4-D-behandelter Galium aparine-Keimpflanzen*

Behandlungsstadium	*Reduktion der Blattspreiten*							
	fehlend %	im 1. Wirtel %	im 1. und 2. Wirtel %	im 2. Wirtel %	fehlend %	im 1. Wirtel %	im 1. und 2. Wirtel %	im 2. Wirtel %
I	32	63	5	—	69	30	1	—
II	78	5	4	13	70	30	—	—
III	82	—	—	18	62	37	1	—
	Haupttriebe				*Kotyledonartriebe*			

Den höchsten Prozentsatz an *Schmalblättrigkeit* (63%) wiesen die ersten epikotylen Wirtel der Sämlinge des ersten Behandlungsstadiums

auf (Tabelle 2 und Abb. 1 III). Bei den nur wenig älteren Keimlingen des zweiten Stadiums waren die Spreitenanlagen der Primordien des 1. Wirtels nur mehr bei 5% der Probanden und im 3. Stadium überhaupt nicht mehr beeinflußbar. Stattdessen ist beim Stadium II und III der zweite Wirtel in die sensible Phase eingetreten (13% und 18%).

Die Kotyledonartriebe zeigen bezüglich der Blattverschmälerungen das gleiche Verhalten, das bereits aus Tabelle I ersichtlich war. Da sie sich offensichtlich langsamer weiterentwickelt haben als die Primärachse, wurden bei allen drei Stadien fast alle verschmälerten Blätter im 1. Wirtel gefunden.

Tabelle 3. *Das Vorkommen von Blattwirtel-Anomalien an den Haupttrieben 2,4-D-behandelter Galium aparine-Keimpflanzen*

Behandlungsstadium	*Bildungsanomalien der Blattwirtel*								
		im 3. Wirtel				im 4. Wirtel			
	fehlend								
	%	%	%	%	%	%	%	%	%
I	21	11	60	1	4	—	—	1	2
II	74	4	1	—	—	1	5	4	11
III	98	—	—	—	—	—	2	—	—
		Haupttriebe							

Am dritten Sproßknoten kamen weder an den Haupt- noch an den Seitenachsen Blätter mit reduzierten Spreiten vor, wohl aber *Umbildungen des gesamten Wirtels* (Tabelle 3). Bei der Mehrzahl der Probanden des Stadiums I wies die Primärachse die bereits erwähnte charakteristische Blattfolge auf (Abb. 1 III und Abb. 5 I): 1. Wirtel = verschmälert; 2. Wirtel = normal; 3. Wirtel = verwachsen (71%). Beim 2. Behandlungsstadium war der Prozentsatz an Abweichungen im 3. Wirtel schon wesentlich geringer (5%) und im Stadium III fehlten sie an der Primärachse ganz.

Ähnlich wie bei den Blattverschmälerungen waren auch die Wirtelumbildungen im Stadium II in der Hauptsache auf den folgenden (hier vierten) Wirtel verschoben, wo jedoch die Reduktion der Blattzahl (15%) gegenüber den Verwachsungen (5%) überwiegt. Im Stadium III fehlen die Anomalien auch im 4. Wirtel fast ganz.

In Abb. 5 I und II sind die beiden am häufigsten vorkommenden Umbildungs-Typen des ersten und zweiten Stadiums schematisch wiedergegeben.

Bei den *Kotyledonartrieben* (Tabelle 4) fehlt im allgemeinen der an der Hauptsache zwischen die verschmälerten und die verwachsenen Blätter zwischengeschaltete normal gestaltete Wirtel. Während sich dort die Anomalien bis zum 4. Wirtel ausdehnten, waren sie an den Kotyledonartrieben nur bis zum 3. Wirtel feststellbar, was mit der bereits erwähnten langsameren Entwicklung der Seitenachsen zu erklären ist. Bei 60% der untersuchten Seitensprosse von Pflanzen des 1. Behandlungsstadiums war die Blattzahl des 2. Wirtels auf 3 oder 2 reduziert. Bei 20% der Probanden des 2. Stadiums war das gleiche im 3. Wirtel zu beobachten.

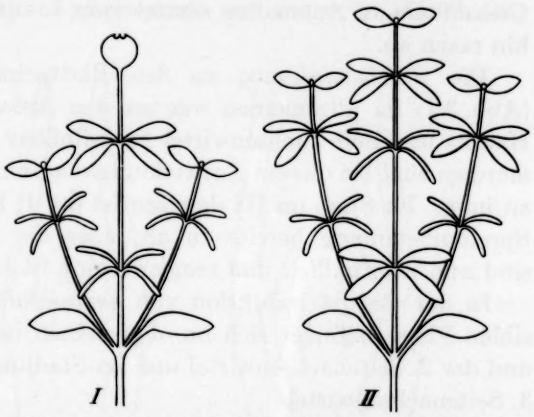


Abb. 5. Schematische Darstellung der nach 2,4-D-Behandlung am häufigsten beobachteten anomal gestalteten *G. aparine*-Keimpflanzen. I erstes Behandlungsstadium; II zweites Behandlungsstadium

Die Kotyledonartriebe des dritten Behandlungsstadiums wiesen, wie zu erwarten, insgesamt einen etwas höheren Prozentsatz an Anomalien auf als die dazu gehörigen Primärachsen, und zwar im 2. Wirtel Verwachsungen und im 3. Wirtel mehr Wirtelreduktionen.

Tabelle 4. *Das Vorkommen von Blattwirtel-Anomalien an den Kotyledonartrieben 2,4-D-behandelter Galium aparine-Keimpflanzen*

Behandlungsstadium	*Bildungsanomalien der Blattwirtel*								
		im 2. Wirtel				im 3. Wirtel			
	fehlend								
	%	%	%	%	%	%	%	%	%
I	33	2	2	20	40	—	—	2	1
II	61	2	2	6	8	—	1	9	11
III	78	3	1	—	—	4	3	4	7
	Kotyledonartriebe								

In den Schemata der Abb. 5 sind die Verhältnisse an den Kotyledonartrieben ebenfalls so wiedergegeben, wie sie im 1. und 2. Stadium am häufigsten gefunden wurden.

Zusammenfassung der makroskopischen Befunde: Die nach Behandlung verschieden weit entwickelter *Galium aparine*-Keimpflanzen auftretenden Blattmißbildungen werden jeweils nur an dem Blattwirtel ausgebildet, der sich zur Behandlungszeit gerade in einer für die Induktion der betreffenden Aberration empfindlichen Phase befindet. Die Gesamtzahl an Anomalien nimmt vom 1. zum 3. Behandlungs-Stadium hin rasch ab.

Die *Spreitenanlegung* an den Blattprimordien ist im Stadium I (Abb. 3 I) im allgemeinen nur an den Anlagen der ersten epikotylen Haupt- und Seitenachsenwirtel beeinflußbar, die höher inserierten Primordien sind bei diesem Entwicklungsstadium zur Behandlungszeit noch zu jung. Im Stadium III dagegen ist der 1. Hauptachsenwirtel für eine Spreitenhemmung bereits zu alt, aber die Primordien des 2. Wirtels sind nun empfindlich und reagieren mit Blattverschmälerungen.

In der für die Induktion von *kongenitalen Blattverwachsungen* sensiblen Phase befindet sich im allgemeinen im Stadium I der 3. Haupt- und der 2. Seitenachsenwirtel und im Stadium II der 4. Haupt- und der 3. Seitenachsenwirtel.

Wirtelreduktion (3- oder 2-Zähligkeit) kommt an der Hauptachse vorwiegend im 4. Wirtel des 2. Stadiums und an den Kotyledonartrieben im 2. Wirtel des ersten und im 3. Wirtel des 2. Behandlungsstadiums vor.

An den Hauptachsen überwiegen die Verwachsungen, an den Seitenachsen die Wirtelreduktionen.

Offenbar entspricht jeder Entwicklungsphase des Sproßvegetationspunktes ein bestimmter Typ der aberranten Weiterentwicklung in der Reihenfolge: Wirtelreduktion, Blattverwachsungen, Spreitenhemmung.

Der bei der am häufigsten beobachteten Blattfolge (Abb. 1 III und Abb. 5 I) zwischen den ersten verschmälerten und den dritten verwachsenen Wirtel eingeschobene, vollkommen normal ausgebildete Blattwirtel weist darauf hin, daß der von der Pflanze aufgenommene Wirkstoff ziemlich rasch abgebaut wird. Nach unseren Schätzungen würden Primordien, die für die Ausbildung von Verwachsungen gerade zu alt sind, innerhalb von 20 bis 30 Stunden das für die Spreitenbeeinflussung sensible Stadium erreicht haben.

Daher und auf Grund der mitgeteilten Befunde ist es möglich, das Ausgangsstadium jeder einzelnen Fehlentwicklung anatomisch genau festzulegen.

II. Anatomische Untersuchung der für die festgestellten Anomalien sensiblen Stadien des Sproßvegetationspunktes

1. Reduktion der Blattspreiten. Bei der 2,4-D-induzierten Schmalblättrigkeit handelt es sich nicht eigentlich, wie bei den Verwachsungen, um eine wirkstoffbedingte Aberration pflanzlicher Organbildung, son-

dern um Desorganisation der Gewebedifferenzierung. Über Anatomie und Entwicklungsgeschichte derart veränderter Blätter liegen bereits gründliche Untersuchungen vor, so daß wir uns kurz fassen können.

In Abb. 6 sind Querschnitte durch Keimpflanzen der drei Behandlungsstadien wiedergegeben. Wie man aus Tabelle 2 entnehmen kann, ist im Stadium I (Abb. 6 II) im allgemeinen nur der erste Wirtel, im

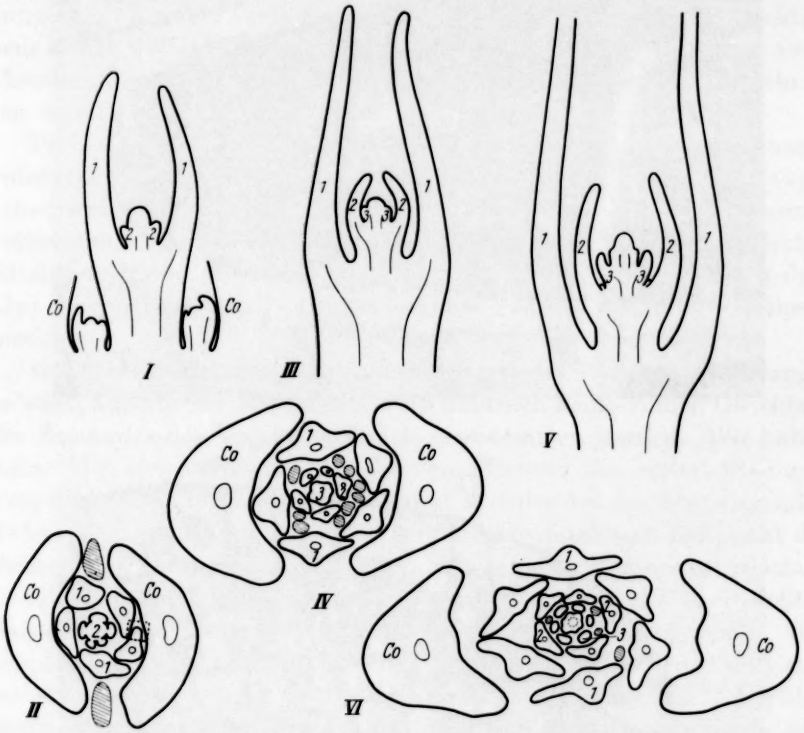


Abb. 6. Längs- und Querschnitte durch verschieden weit entwickelte Keimpflanzen von *G. aparine* zum Zeitpunkt der 2,4-D-Behandlung. I u. II erstes, III u. IV zweites, V u. VI drittes Behandlungsstadium. *Co* = Kotyledonen; die Hauptblätter der auf die Kotyledonen folgenden Wirtel sind mit arabischen Ziffern numeriert, drüsige Anhänge schraffiert

Stadium II (Abb. 6 IV) der erste und (oder) der zweite, im Stadium III (Abb. 6 VI) nur noch der zweite Wirtel in dem für die Induktion von Spreitenhemmungen sensiblen Stadium. Abb. 7 I zeigt den in Abb. 6 II durch Einrahmung gekennzeichneten Ausschnitt in stärkerer Vergrößerung. Demnach ist die sensible Entwicklungsphase charakterisiert durch die noch vollmeristematischen primordialen Spreitensäume. Abb. 7 II stellt einen Querschnitt durch die Spreitenanlage 3 Tage nach der 2,4-D-Behandlung dar. Die beginnende Degeneration, speziell der Zellen des zukünftigen Schwammparenchyms, ist bereits erkennbar.

Offenbar hemmt die 2,4-D selektiv die gerade einsetzenden Differenzierungsvorgänge in den Zellen, die normalerweise zur Ausbildung

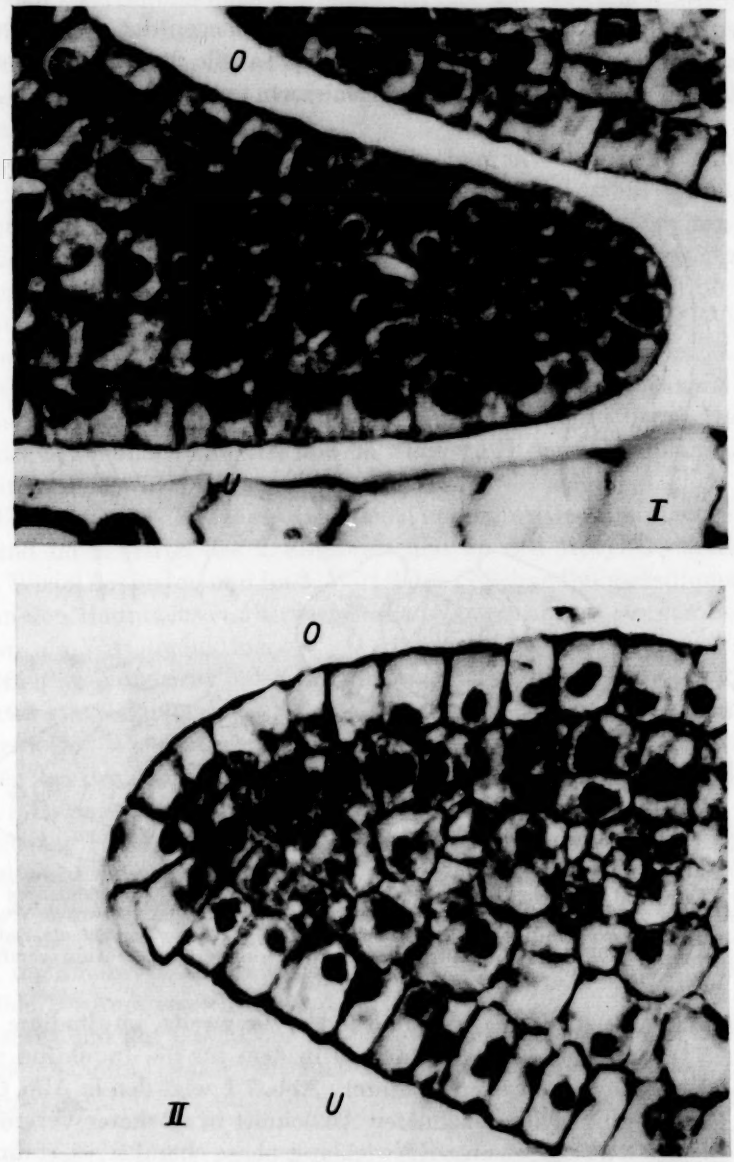


Abb. 7. Spreitensaum des in Abb. 6 II umrandeten Primordiums zur Zeit der 2,4-D-Behandlung (I) und 3 Tage später (II). *O* = Ober- u. *U* = Unterseite der Blattanlagen

des Interzellularensystems im Mesophyll führen würden. Stattdessen entsteht ein von einander genäherten Leitsträngen durchzogenes,

dichtes, großzelliges Gewebe, das die typische Schichtung des normalen Mesophylls weitgehend vermissen läßt.

Wir können somit für *Galium aparine* die Ergebnisse bestätigen, die Burton (1947) und Watson (1948) für *Phaseolus* und Burton (1950) und McIllrath u. Mitarb. (1953) für *Gossypium* mitgeteilt haben.

2. Blattverwachsungen. Obwohl es sich bei den durch kongenitale Verwachsung mehrerer Blattanlagen zustande kommenden Tütenbildungen um eine bekannte und von zahlreichen Pflanzenarten beschriebene 2,4-D-Mißbildung handelt, sind über deren Entstehungsweise zwar Theorien, aber keine genaueren anatomisch-histologischen Untersuchungen veröffentlicht worden.

Da bei den 2,4-D-behandelten *Galium*-Keimpflanzen das Vorkommen vollständig verwachsener Blattkreise (Abb. 2) fast ganz auf den 3. Hauptachsenwirtel des ersten Stadiums beschränkt ist und hier relativ häufig vorkommt, kann der Zustand von zum Behandlungstermin fixierten Sämlingen dieser Entwicklungsstufe (Abb. 6 I und II) Auskunft geben über die für derartige Bildungen sensible Phase des Sproßvegetationspunktes.

Bei der Einschätzung der Entwicklungsstufe nach den oben angegebenen äußerlichen Merkmalen kann natürlich keine völlige Gleichheit des Zustandes des Vegetationskegels angenommen werden. Wir haben daher von einer größeren Anzahl von Pflanzen des ersten Stadiums Präparationen und Schnitte angefertigt und den bei der überwiegenden Mehrzahl gefundenen Zustand der Vegetationsspitze zum Zeitpunkt der Behandlung als die für die Tütenbildung sensible Phase angesprochen.

Abb. 8 I gibt den Vegetationskegel der in Abb. 6 I dargestellten Keimpflanze des ersten Stadiums in stärkerer Vergrößerung wieder. Wie aus den Abbn. 6 I und II und 8 hervorgeht, ist der dritte Blattwirtel, der sich später zur Tüte entwickelt, zum Zeitpunkt der 2,4-D-Applikation noch nicht äußerlich sichtbar vorhanden, aber wie vereinzelte subepidermale Periklinalteilungen im Flankenbereich des Vegetationskegels beweisen, gerade in der Anlegung begriffen.

Daß bereits mit der ersten mikroskopisch erkennbaren Hervorwölbung der Blattanlagen des 3. Wirtels die für die Induktion von Verwachsungen sensible Phase abgeschlossen ist, geht aus den in Abb. 6 III und IV wiedergegebenen Schnitten von zum Behandlungstermin fixierten Pflanzen des 2. Stadiums hervor. Hier befindet sich der 3. Wirtel (3), ebenso wie bei den Probanden des ersten Stadiums der 2. Wirtel (2 in Abb. 6 I u. II), in einer Entwicklungsphase, die für die Induktion von Blattverwachsungen bereits zu alt und für die Beeinflussung der Spreitenentwicklung noch zu jung ist.

Obwohl bei Pflanzen, die auf Entwicklungsstufe III behandelt wurden (Abb. 6 V und VI), der 5. Wirtel ein nach den Erfahrungen an jüngeren

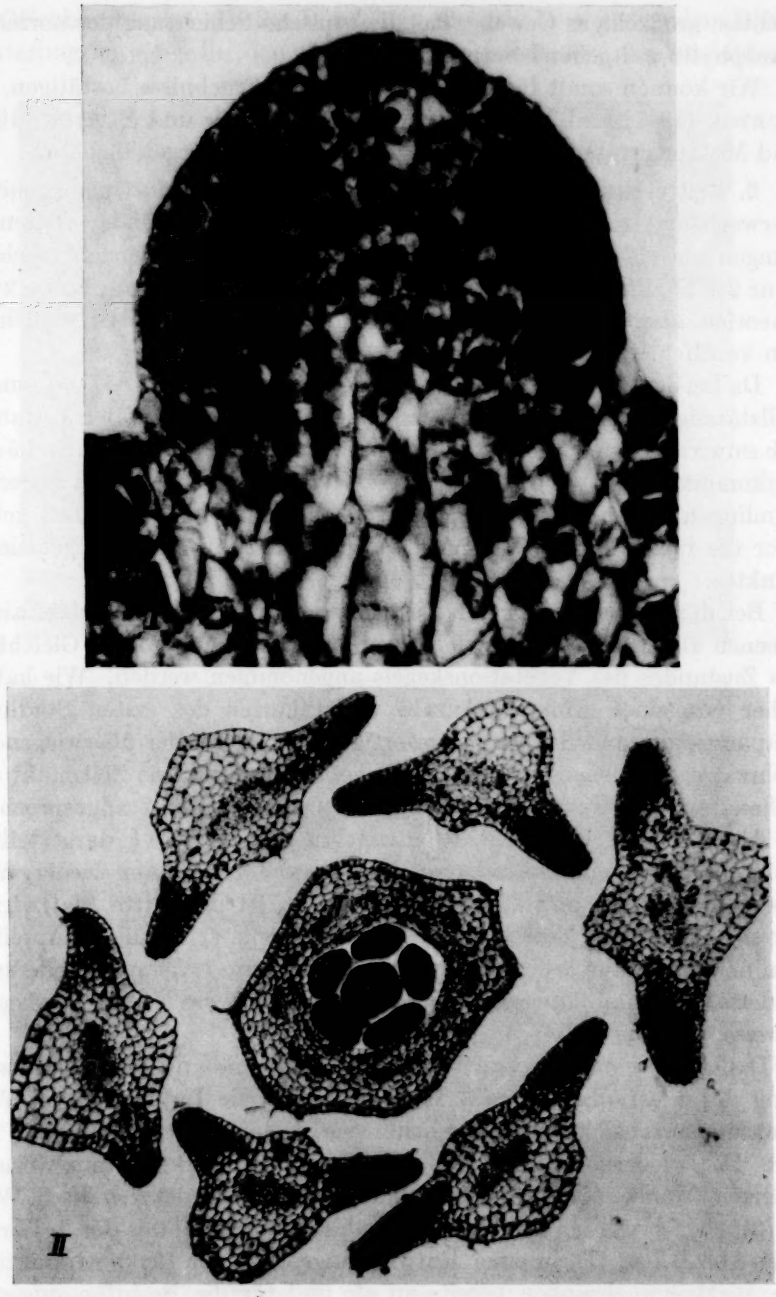


Abb. 8. I Vegetationskegel der in Abb. 6 I im Längsschnitt dargestellten Keimpflanze von *G. aparine*. Für die Induktion von Blattverwachsungen sensibles Stadium. II Querschnitt durch den normal ausgebildeten 2. und den gamophyll entwickelten 3. (*T*) Wirtel einer im Stadium I mit 2,4-D behandelten Keimpflanze. Zwei weitere normal gestaltete Wirtel sind bereits erkennbar

Behandlungsstadien als sensibel anzusprechendes Stadium erreicht hat, wurden in diesem Wirtel keine Anomalien mehr angetroffen, wie ja auch

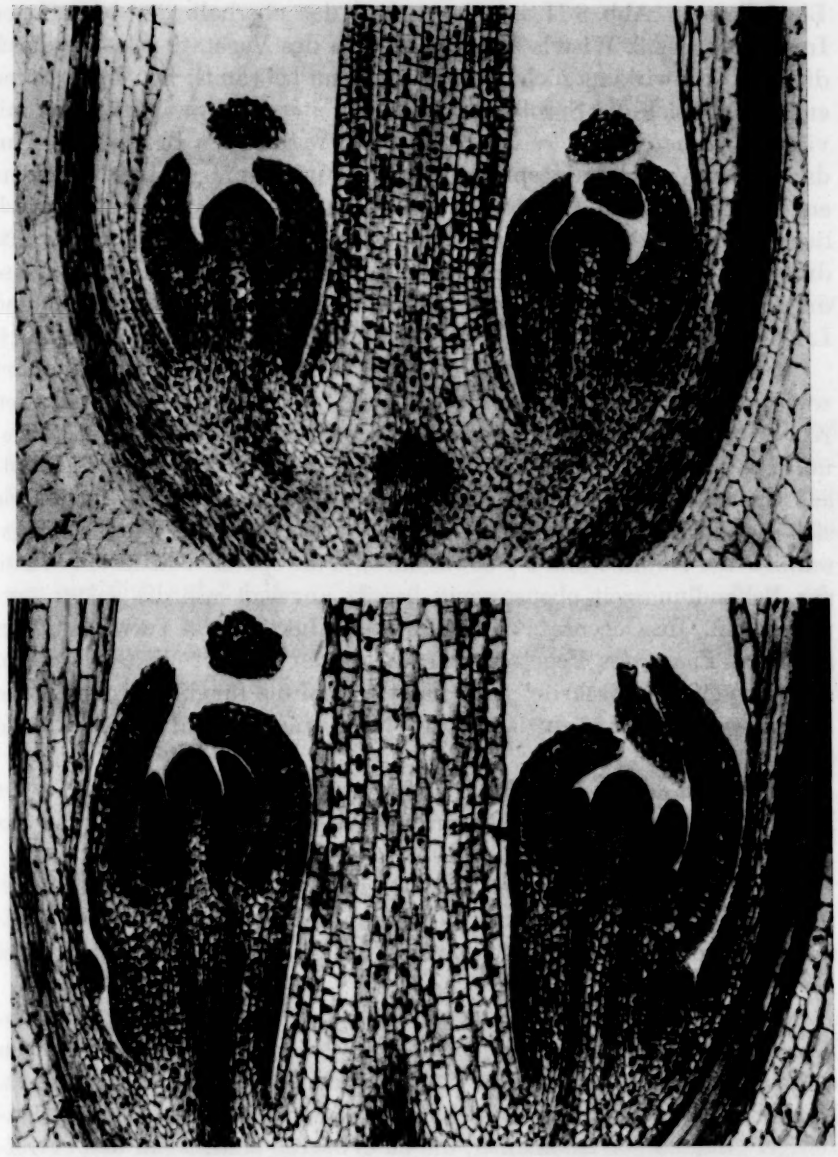


Abb. 9. Keimpflanzen von *G. aparine*. Längsschnitte durch die Kotyledonarknospen des 2. (I) und 3. (II) Behandlungsstadiums

der Prozentsatz an Anomalien im 4. Wirtel des 2. Stadiums weit hinter den im 3. Wirtel des 1. Stadiums gefundenen zurückbleibt. Hierin

äußert sich die zunehmende Unempfindlichkeit der sich weiterentwickelnden Keimpflanzen gegenüber der 2,4-D-Einwirkung.

Wie Abb. 4 III und der Querschnitt durch eine fertig ausgebildete Blatt-Tüte in Abb. 8 II beweisen, wird der oberhalb der betroffenen Initialzone des 3. Wirtels liegende Bereich des Vegetationskegels durch die 2,4-D-Einwirkung nicht geschädigt, denn bei sämtlichen Blatt-Tüten entwickelte sich die Sproßachse normal weiter, und zwar meistens mit vier- bis sechszähligen, seltener mit einem reduzierten Blattwirtel. Nur da, wo das Verwachsungsprodukt des 3. Wirtels infolge einer besonders engen Öffnung dem Herauswachsen des Achsenendes ein unüberwindliches Hindernis bot, ging der Primärsproß sekundär zugrunde und wurde durch einen Kotyledonartrieb ersetzt. Derartige von der Hauptachse durchwachsene gamophylle Blattwirtel haben KIERMAYER (1957) und LINSER und KIERMAYER (1958) von *Bryophyllum tubiflorum* abgebildet.

3. Reduktion der Blattzahl im Wirtel. Wie oben näher ausgeführt wurde, traten abnorm 3- oder 2-zählige Wirtel besonders häufig an den Kotyledonartrieben auf und zwar im Stadium I vor allem im 2. (60%) und im Stadium II im 2. und 3. Wirtel (14% und 20%). An den Hauptachsen, wo reduzierte Wirtel an und für sich seltener waren, fanden sie sich etwas häufiger (15%) im 4. Wirtel des Stadiums II. Wie die Längsschnitte der Abbn. 6 und 9 I beweisen, sind die später reduzierten Wirtel zur Behandlungszeit ebensowenig bereits angelegt wie die später verwachsenen. Im Gegensatz zu der für die Induktion von Verwachsungen sensiblen Phase des Vegetationskegels weisen die mit Wirtelreduktion reagierenden Sproßscheitel noch nicht einmal die für die bevorstehende Anlegung des (später reduzierten) Blattkreises symptomatische maximale Streckung auf.

Man kann daraus schließen, daß bei *Galium*-Keimpflanzen die in der Mitte zwischen 2 Wirtelausgliederungen liegende Plastochronphase das Induktionsstadium für eine 2,4-D-bedingte Blattreduktion darstellt.

Wie die Querschnitte der Abb. 10 zeigen, handelt es sich bei den reduzierten Wirteln stets um die beiden Hauptblätter, die bei Dreizähligkeit nur eine und bei Zweizähligkeit keine Interpetiolarstipel besitzen.

Zusammenfassung der anatomischen Befunde: Die wichtigsten Ergebnisse der anatomischen und entwicklungsgeschichtlichen Untersuchungen sind im Schema Abb. 11 noch einmal übersichtlich zusammengestellt. Die Reihe gibt zwei Plastochrone des Sproßscheitels wieder, unter gleichzeitiger Angabe der Anomalien, die zu erwarten sind, wenn das betreffende Stadium unter die Einwirkung der 2,4-D gerät.

Aus dem Schema wird deutlich, warum an der Hauptachse zwischen der Blatt-Tüte (bzw. dem reduzierten 3. Wirtel) und dem mit verschmälerten Blättern besetzten ersten Wirtel fast immer ein Wirtel mit nor-

maler Beblätterung zu finden war. Junge Primordien sind zunächst unempfindlich gegen die 2,4-D-Einwirkung, sie reagieren erst wieder im Stadium der Ausgliederung der Spreitensäume.

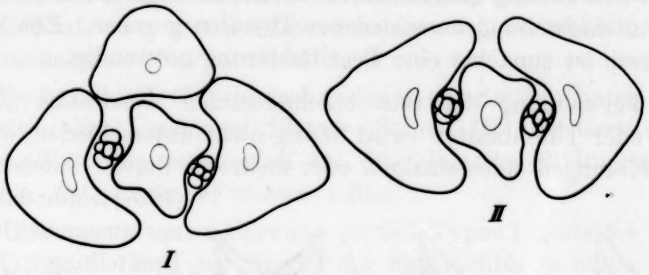


Abb. 10. *G. aparine* nach 2,4-D-Behandlung. Querschnitte durch einen anomal drei- (I) bzw. zweigliedrigen (II) Wirtel

Diskussion

1. Die sogenannte 2,4-D-Resistenz von Galium aparine. Bekanntlich kann man das Klettenlabkraut mit den üblichen 2,4-D-haltigen Herbicidlösungen nicht vernichten. Die Ursachen dieser auffallenden Resistenz sind noch nicht befriedigend geklärt. Unsere Beobachtung, daß nur relativ junge Keimpflanzen merklich auf 2,4-D-Besprühung reagieren, könnte dahingehend gedeutet werden, daß der Wirkstoff *vorwiegend durch die Kotyledonen aufgenommen wird* und daß die Epidermis der epikotylen Teile Eigenschaften besitzt, die die Absorption der Lösungen verhindert.

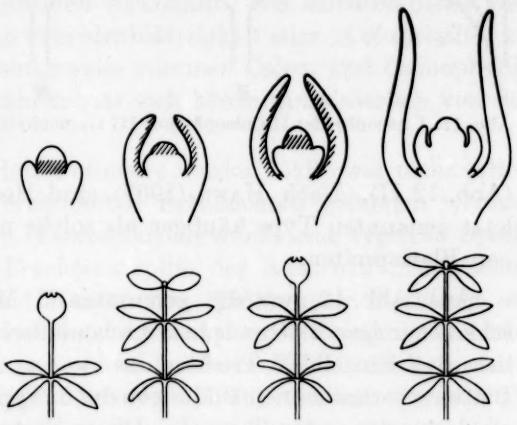


Abb. 11. Schematische Darstellung der Ergebnisse der anatomischen Untersuchung. Sensible Zonen der Behandlungsstadien schraffiert. (Näheres im Text)

Dies ist jedoch nicht der einzige in Frage kommende, Resistenz bedingende Faktor. Die der Stadienspezifität genau entsprechende Verteilung der Anomalien an den von uns untersuchten *Galium*-Keimpflanzen spricht dafür, daß die 2,4-D im Gewebe besonders rasch inaktiviert wird. Biebl (1953) gibt für *Galium* eine gute (derjenigen der Gramineen vergleichbare) Überlebensfähigkeit von Epidermisschnitten in 2,4-D-Lösungen an.

2. Probleme der morphologischen Klassifizierung exogen bedingter Tütenbildungen. Mit der Beobachtung experimentell induzierter Gestalt-

anomalien bei höheren Pflanzen ist auch die Frage nach der Vergleichbarkeit derartiger Aberrationen mit entsprechenden normalen Bildungen aufgetaucht. Speziell die Trichterblätter und Blatt-Tüten, die nach Herbicid-Anwendung gefunden wurden, haben wegen ihrer Auffälligkeit Anlaß zur Aufstellung verschiedener Theorien gegeben. Ehe wir diese diskutieren, ist zunächst eine Begriffsklärung notwendig.

Bei Verwendung der rein beschreibenden Ausdrücke „Trichter- Becher- oder Tütenblätter" wird häufig nicht unterschieden, ob es sich um Umbildungen eines einzigen oder mehrerer Blätter handelt. HANF (1957) trennt daher in seiner zusammenfassenden Darstellung „Trichterblätter aus Einzelblättern" von aus mehreren Blättern zusammengesetzten Trichterformen. Zu den Einzelblatt-Morphosen zählen sowohl Blätter mit trichterartigen Spreiten (Abb. 12 I) als auch solche, die als Ganze schlauchartig ausgebildet sind und als geschlossene Röhre das gesamte Achsenende rings umwachsen haben (Abb. 12 II). Nach HANF (1957) sind Herbicid-Mißbildungen des zuletzt genannten Typs häufiger als solche mit schlauchartig verwachsenen Blattspreiten.

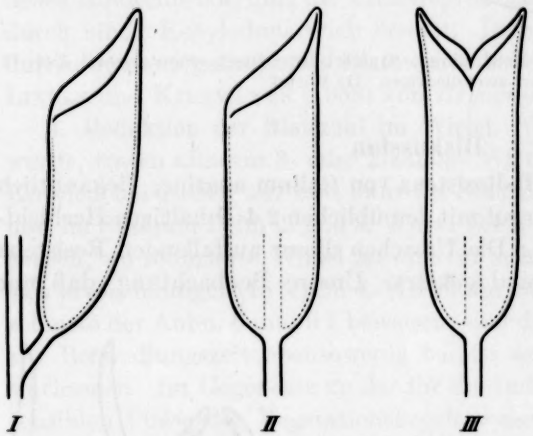


Abb. 12. I Ascophyllie; II Coleophyllie; III Gamophyllie

Aus Abb. 12, wo die genannten 3 Möglichkeiten trichter- oder schlauchartiger Blattmorphosen schematisch dargestellt sind, wird deutlich, daß Einzelblatt-Trichter des zweiten Typs (II) den aus mehreren Blättern verwachsenen Bildungen des 3. Typs (III) sehr viel näher stehen als denen des ersten Typs (I). Dieser Sachverhalt ist vielfach verkannt worden, weil der oft stielartig verengte basale Teil eines Trichterblattes vom Typus.II äußerlich völlig einem unifacialen Blattstiel gleicht, wie er beim Typus I vorliegt.

Wir möchten auf Grund unserer Erfahrungen bei *Galium aparine* vermuten, daß Blätter, die gemäß Typus I umgestaltet sind, auf einem späteren Primordialstadium vom Wirkstoffreiz betroffen wurden als solche des 2. und 3. Typs, denn bei diesen handelt es sich um eine aberrante Entwicklung des gesamten Insertionsbereiches am Vegetations-

kegel und bei jenen nur um eine die Spreitenanlegung des einzelnen Blattes betreffende Anomalie.

Da somit eine sorgfältige Scheidung der 3 Typen von teratologischen Blattverwachsungen für die weitere Klärung der Phänomene unbedingt erforderlich ist, wäre es wünschenswert, sie auch nomenklatorisch auseinanderzuhalten.

Als Fachausdruck für eine mehr oder weniger weit gehende kongenitale Verwachsung mehrerer Blätter (Typus III) existiert das Wort „*Gamophyllie*", das daher auch für teratologische Bildungen der geschilderten Art verwendet werden sollte.

Für Blätter, die normalerweise gemäß Typus I gestaltet sind, hat Troll (1939, S. 1835) den Begriff des Schlauchblatts näher definiert. Wir würden es daher für richtig halten, das Phänomen als „*Ascophyllie*" zu bezeichnen. Keinesfalls darf der Begriff des Schlauchblattes auf die stengelumfassend verwachsenen Blattmißbildungen (Typus II) ausgedehnt werden.

Ein Fachausdruck für die in Abb. 12 II dargestellten Blattverwachsungen existiert unseres Wissens nicht, da eine völlige Umwachsung des Achsenendes durch ein einziges Blattorgan normalerweise nur bei Niederblättern oder in Form von mehr oder weniger weit reichenden röhrig geschlossenen Blattscheiden vorkommt. Wir möchten daher vorschlagen, in diesem Fall von Scheidenblättrigkeit oder „*Coleophyllie*" zu sprechen. In ihrer Entstehungsweise stimmen Coleo- und Gamophyllie im allgemeinen überein, während sie sich hierin grundsätzlich von der Ascophyllie unterscheiden.

Schließlich muß noch daran erinnert werden, daß zwar nicht selten Blattverwachsungen an verbänderten Sproßachsen gefunden werden, daß aber die Verbänderung (Fasciation) als solche eine typische *Sproß*mißbildung ist. Unseres Erachtens sollte der Ausdruck „Ringfasciation", wie ihn Linser und Kiermayer (1958) unter Berufung auf Gorter (1949) für als „Verschmelzungsprodukt von Blättern" beschriebene Gamophyllien verwenden, nicht in dieser Weise verallgemeinert werden. Man vergleiche hierzu Schoute (1936) und van Steveninck (1956).

3. Fragen der Entstehungsweise und Homologisierung 2,4-D-induzierter Gamophyllien. Von Denffer (1951) hat bei verschiedenen dekussiert beblätterten Dikotylen nach Behandlung mit Trijodbenzoesäure congenitale Verwachsungen einzelner Blattpaare beobachtet. Er erklärt diese Anomalie als Folge einer Wirkstoff-bedingten extremen Förderung der (auch normalerweise gamophyllen) basalen Streckungszone bei gleichzeitiger Hemmung des Oberblattwachstums. Danach wären experimentell induzierte Blatt-Trichter, von ihren freien äußersten Spitzen abge-

sehen, den Basalteilen der sie zusammensetzenden, normalerweise frei entwickelten Blätter homolog.

Ähnlich versteht auch HANF (1953) die auf der Umbildung von Einzelblattanlagen beruhenden, scheidig verwachsenen Röhrenblätter bei *Plantago lanceolata*. Diese sollen dadurch zustandekommen, daß der „die Achse als schmales Häutchen umfassende Blattgrund sich streckt, während die Spreite kurz bleibt". Derselbe Autor, der eine Fülle von Beobachtungsmaterial über 2,4-D-bedingte Blattmorphosen zusammengetragen hat, konnte jedoch nicht übersehen, daß Blattverwachsungen auch dann vorkommen, wenn „die Anlage zur Gamophyllie" (in Form eines bereits normalerweise gamophyllen Insertionsbereichs) „nicht gegeben ist". Zur Erklärung wird auf die außerordentlich engen Abstände zwischen den einzelnen Blattanlagen am Vegetationskegel hingewiesen.

Daß später anomal verwachsene Blattorgane zum Zeitpunkt der Einwirkung des auslösenden Faktors überhaupt noch nicht angelegt sein könnten, wird von HANF (1953) nur bezüglich eines besonders extremen Falles in Erwägung gezogen, nämlich bei den nach 2,4-D-Einwirkung zu einer geschlossenen Glockenform verwachsenen Strahlenblüten von *Anthemis arvensis*.

PLANTEFOL (1952a u. b), der 2,4-D-induzierte Gamophyllien bei *Linum usitatissimum*[1] untersucht hat, legt mehr Gewicht auf die Schwierigkeit, die die Vorstellung bereitet, daß bis zu 9 nicht auf gleicher Höhe inserierte Primordien durch Streckung des sogenannten „gemeinsamen Insertionsbereichs" zu einer geschlossenen Blatt-Tüte auswachsen können. Seiner Ansicht nach kommen Gamophyllien nicht durch abnorme Wachstumsverteilung an bereits individualisierten Anlagen zustande, sondern es handele sich vielmehr um die foliose Ausbildung des gesamten vom Autor als „Initialring" bezeichneten Bereichs *zukünftiger* Blattanlagen am Vegetationskegel.

Sowohl PLANTEFOL als auch VON DENFFER und HANF haben nur fertig ausgewachsene Mißbildungen zur Verfügung gestanden.

Lassen sich die hier zitierten Vorstellungen auf die Verhältnisse bei *Galium aparine* anwenden? Die Entwicklungsgeschichte normal gestalteter *Galium*-Blattwirtel, in deren Verlauf, von den beiden Hauptanlagen ausgehend, ein „Ringwall' (FRANKE) gebildet wird, bietet alle Voraussetzungen für eine Homologisierung der 2,4-D-induzierten Gamophyllien im Sinne von VON DENFFER und HANF. Bei den Blatt-Tüten würde es sich dann um den extrem geförderten gamophyllen Blattgrund handeln, welchem die rudimentierten Oberblatt-Anteile als freie Spitzen ansitzen (Abb. 2).

[1] Man vergleiche hierzu auch RÜDIGER (1952).

Wie unsere Untersuchungen ergeben haben, handelt es sich jedoch sicher nicht um eine Verschiebung der Hauptwachstumszonen an bereits angelegten Primordien, sondern um eine 2,4-D-Beeinflussung der Bildungstendenzen im Bereich zukünftiger Anlagen. Insofern sind unsere Ergebnisse eine volle Bestätigung der Schlüsse, die PLANTEFOL aus der Gestaltung ausgewachsener Blatt-Tüten gezogen hat.

Nun ist aber bei *Linum usitatissimum*, wo die Verhältnisse (was die für die Induktion gamophyller Terata sensible Phase des Vegetationskegels betrifft) höchstwahrscheinlich denen bei *Galium aparine* gleichen, eine zerstreute Blattstellung gegeben, so daß kein entwicklungsgeschichtlich nachweisbarer gemeinsamer Blattgrund vorhanden ist, mit dem man die gamophyllen Teile der Tüten homologisieren könnte. Wie man bei HANF (1953 u. 1954) nachlesen kann, gibt es zahlreiche Beispiele dieser Art. Wegen deren sonstiger Übereinstimmung mit den auf Dekussation beruhenden Gamophyllien, möchten wir die für diese entwickelten Homologie-Vorstellungen zunächst einmal in Frage stellen. Eine Antwort können nur weitere entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen an 2,4-D-Anomalien anderer Pflanzenarten bringen.

Damit, daß wir bei *Galium aparine* nachweisen konnten, daß die 2,4-D nur an einem Vegetationskegel, der noch keine Primordien ausgebildet hat, Gamophyllien induzieren kann, wird eine Vorstellung gestützt, die wir bereits in einem anderen Zusammenhang kurz diskutiert haben (HACCIUS 1955a). Wir stellen uns, Gedankengängen BÜNNINGS (1953a u. b) folgend, den Wirkungsmechanismus der 2,4-D folgendermaßen vor: Bei der Anlegung von Blattprimordien am Vegetationskegel handelt es sich um die Herausbildung eines „Musters", das durch von bestimmten Polen ausgehende stoffliche Gradienten aufgebaut und erhalten wird. Die Überschwemmung des gesamten Bereichs mit dem synthetischen Wuchsstoff ebnet diese Gradienten ein, so daß die Sonderung innerhalb der Bereiche zukünftiger Anlagen unterbleibt und der gesamte „Bildungsring" unter Beibehaltung der übrigen Blatteigenschaften zu einem tüten- oder schlauchförmigen Gebilde auswächst.

Zusammenfassung

Junge *Galium aparine*-Pflanzen weisen nach Behandlung der Sämlinge mit 2,4-D-Lösungen Blätter mit verschmälerten Spreiten und (oder) tütenartig verwachsene bzw. reduzierte Blattwirtel auf.

Da die Keimpflanzen nur während einer relativ kurzen Zeit ihrer Entwicklung auf die 2,4-D-Applikation reagieren, konnte gezeigt werden, daß die Anomalien jeweils nur an dem Blattwirtel entstehen, der zur Behandlungszeit gerade ein für die Induktion der betreffenden Aberration empfindliches Stadium erreicht hat.

Die sehr kurze Sensibilitätsphase machte es möglich, das Ausgangsstadium der beobachteten Fehlentwicklungen festzustellen und anatomisch zu untersuchen.

Befindet sich der Vegetationspunkt zur Zeit der 2,4-D-Anwendung gerade in dem zwischen der Ausgliederung zweier Wirtel liegenden Plastochronabschnitt, dann ist eine Reduktion der Gliederzahl des folgenden Wirtels zu erwarten.

Das Induktionsstadium für die Ausbildung kongenital verwachsener Blatt-Tüten (Gamophyllie) ist charakterisiert durch die der Anlegung eines Wirtels unmittelbar vorangehende maximale Streckung des Vegetationskegels. Diese Phase ist bereits mit Beginn einer mikroskopisch erkennbaren Hervorwölbung von Blattanlagen abgeschlossen.

Junge noch nicht differenzierte Primordien sind nicht beeinflußbar, jedenfalls zeigen sie später keine erkennbaren Veränderungen. Erst mit der Anlegung der Spreitensäume treten sie wieder in eine neue Sensibilitätsphase ein. Es kommt zu einer Hemmung der Mesophylldifferenzierung und infolgedessen zu verschmälerten Blattspreiten.

Fragen der Homologisierung 2,4-D-induzierter Blattverwachsungen und ihrer morphologischen Klassifizierung werden diskutiert.

Das bei der Untersuchung verwendete Mikrotom wurde dankenswerterweise von der Deutschen Forschungsgemeinschaft zur Verfügung gestellt.

Herrn O. HELFRICH danken wir für Hilfe bei der Anfertigung der Photographien.

Literatur

ÅBERG, E.: Effect of hormone derivatives on weeds and cultivated plants. Kungl. Lantbrukshögsk. Ann. **16**, 695 (1949). — BÜNNING, E.: Entwicklungs- und Bewegungsphysiologie der Pflanze, 3. Aufl. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1953a. — BÜNNING, E., u. D. v. WETTSTEIN: Polarität und Differenzierung an Mooskeimen. Naturwissenschaften **40**, 147 (1953b). — BURTON, D. E.: Formative effects of certain substituted chlorophenoxy compounds on bean leaves. Bot. Gaz. **109**, 183 (1947). — Anatomy of cotton leaf and effects induced by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. Bot. Gaz. **111**, 325 (1950). — DECANDOLLE, A. P.: Organographie végétale, Bd. 1. Paris 1827. — DENFFER, D. v.: Durch die Behandlung mit 2,3,5-Trijodbenzoesäure hervorgerufene Gamophyllien. Ber. dtsch. bot. Ges. **64**, 269 (1951). — FRANKE, M.: Beiträge zur Morphologie und Entwicklungsgeschichte der Stellaten. Bot. Ztg **45**, 33 (1896). — FURUYA, M., and SH. OSAKI: Effects of the vapour of Methyl 2,4-dichlorophenoxyacetate on growth and differentiation in Phaseolus vulgaris. Jap. J. Bot. **15**, 117 (1955). — GAVANDAU, P., et G. DEBRAUX: Nouvelles remarques sur la gamophyllie expérimentale et naturelle. C. R. Trav. Lab. Biol. vég. Fac. Sci. Poitiers **40**, Nr 3 (1952). — GORTER, C. J.: The influence of 2,3,5-triiodobenzoic acid on the growing points of tomatoes. Proc. kon. ned. Akad. Wet. **52**, 1185 (1949). — HACCIUS, B.: Schizokotylie und Pleiokotylie bei Delphinium ajacis. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **86**, 498 (1955a). — Durch Wuchsstoffbehandlung induzierte Veränderungen bei Limnophila heterophylla. Beitr. Biol. Pflanz. **31**, 207 (1955b). — HACCIUS, B., u. G. LINDEN: Untersuchungen zur 2,4-D-Persistenz in pflanzlichen Geweben. Z. Bot. **44**, 145 (1956). — HANF, M.: Keimung von Unkräutern und Kulturpflanzen

nach Behandlung des Bodens mit 2,4-D-Mitteln. Nachrichtenbl. dtsch. Pflanzenschutzdienst **1950**, H. 6. — Wuchsschädigungen und Mißbildungen bei Anwendung von 2,4-dichlorphenoxyessigsäurehaltigen Unkrautbekämpfungsmitteln. Z. Pflanzenbau u. Pflanzenschutz **2**, 145 (1951). — Verwachsungen an Laubblättern und in Kompositenköpfchen, verursacht durch wuchsstoffartige Unkrautbekämpfungsmittel. Planta (Berl.) **41**, 515 (1953). — Über die Änderung der Blattform von Dikotyledonen durch Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D). Beitr. Biol. Pflanz. **33**, 177 (1957). — KIERMAYER, O.: Morphologische Veränderungen an den Blüten von Kalanchoe Blossfeldiana, sowie den Brutpflanzen von Bryophyllum tubiflorum durch synthetische Wuchs- und Hemmstoffe. Phyton (Argent.) **9**, 53 (1957). — LINSER, H., W. FROHNER u. R. KIRSCHNER: Formbildende Wirkungen von Wuchsstoffen. Phyton (Argent.) **3**, 53 (1953). — Veränderungen von Blattmorphologie und Blattfolge bei Erodium cicutarium unter dem Einfluß von Phenoxyessigsäurederivaten. Ber. dtsch. bot. Ges. **68**, 46 (1955). — LINSER, H., u. O. KIERMAYER: Pflanzliche Formbildung — experimentell gesteuert. Naturwiss. Rdsch. **11**, 47 (1958). — LINSER, H., u. R. KIRSCHNER: Zur Beeinflussung der Blattbildung durch Morphoregulatoren. Planta (Berl.) **50**, 211 (1957). — MCILRATH, W. I., and D. R. ERGLE: Developmental stages of the cotton plant as related to the effects of 2,4-D. Bot. Gaz. **114**, 461 (1953). — PLANTEFOL, L.: Sur les „feuilles soudées en cornet" du Linum usitatissimum L. C. R. Acad. Sci. (Paris) **235**, 386 (1952a). — Variations des „cornets foliaires" teratologiques du Linum usitatissimum L. C. R. Acad. Sci. (Paris) **235**, 812 (1952b). — RÜDIGER, W.: Über die Wirkung von U 46 (2,4-D Na) auf Lein. Beitr. Biol. Pflanz. **29**, 185 (1952). — SCHMIDT, O.: Vergleichende Untersuchungen über die herbicide Wirkung der synthetischen Wuchsstoffe 2,4-D und MCPA. Mitt. biol. Zentralanst. Land- u. Forstwirtsch., Berlin-Dahlem **1954**, H. 77. SCHOUTE, J. C.: Fasciation and Dichotomy. Rec. Trav. bot. néerl. **33**, 649 (1936). — STEVENINCK, R. F. M. VAN: The Occurrence of Funnel Leaflets and Ring Fasciations in Yellow Lupins. Ann. Bot. **20**, 385 (1956). — TROLL, W.: Vergleichende Morphologie der höheren Pflanzen, Bd. 1, Teil 2. Berlin 1939. — WATSON, D. P.: An anatomical study of the modification of bean leaves as a result of treatment with 2,4-D. Amer. J. Bot. **35**, 543 (1948). — ZIMMERMANN, P. W.: Formative influences of growth substances on plants. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. **10**, 70 (1942).

Prof. Dr. B. HACCIUS, Botanisches Institut der Universität Mainz

Planta, Bd. 52, S. 230—234 (1958)

Kurze Mitteilung

Aus dem Botanischen Institut der Universität zu Köln

VERNALISATION UND THERMOPERIODISMUS

Von

KLAUS NAPP-ZINN

(Eingegangen am 9. Juni 1958)

1. Problemstellung

Unter dem Begriff des Thermoperiodismus werden bekanntlich solche entwicklungsphysiologischen Erscheinungen zusammengefaßt, die durch einen täglichen Wechsel zweier Temperaturen stärker begünstigt werden als durch ständige Einwirkung gleichbleibender Wärme. Daneben spricht man von Thermoperiodismus auch in solchen Fällen, in denen ein täglicher Wechsel einer förderlichen und einer hemmenden (oder „indifferenten") Temperatur einen ebenso günstigen Effekt zeitigt wie eine dauernde Einwirkung allein der fördernden Temperatur. Eine größere Anzahl diesbezüglicher Beobachtungen betrifft die Keimung von Samen, die bei verschiedenen Pflanzenarten merkwürdigerweise am ehesten durch niedere Temperaturen (etwa $+2$—10^0 C) ausgelöst wird, sei es, daß diese kontinuierlich, sei es, daß sie alternierend mit höheren Wärmegraden dargeboten werden. [Beispiele sind u. a. der Arbeit von LAUER (1953, besonders Abb. 1) zu entnehmen.]

Temperaturen dicht über dem Gefrierpunkt des Wassers führen aber nicht nur in manchen Fällen die Keimung, sondern bei einer Reihe von Gewächsen auch die Blühreife herbei; man spricht dann gewöhnlich von Vernalisation. Es fragt sich nun, ob ein täglicher Wechsel hoher und niederer Temperatur, der sich über eine Reihe von Wochen erstreckt, einen ebenso großen Vernalisationseffekt auslöst wie eine ununterbrochene Kältebehandlung von gleicher Dauer. Der Klärung dieser Frage diente bislang nur eine sehr beschränkte Zahl von Untersuchungen, die bei verschiedenen Objekten entgegengesetzte Befunde zeitigten und z. T. unter nicht genau kontrollierten Bedingungen durchgeführt worden waren.

TETJUREV (1939, 1940) setzte gequollene Caryopsen einer Winterweizensorte (Moskau 02411) vom 19. 4. bis zum 28. 5. 39 täglich eine Zeitlang vernalisierenden Temperaturen aus. Ein maximaler Vernalisationseffekt trat aber nur in denjenigen

Versuchsgruppen ein, die täglich 24 oder 22 Std Kälte erhalten hatten[1]. Auch in Versuchen von Rössger (1947) an Kohlrabi (*Brassica oleracea* var. *gongylodes*, Sorte Wiener Treib) war der Vernalisationseffekt, gemessen am Prozentsatz schossender Individuen, größer bei Pflanzen, die vom 2. 3.—9. 4. 44 ständig bei durchschnittlich 8,6° C gehalten worden waren, als bei solchen, die ebenso lange täglich 13 Std bei durchschnittlich 8,0° und 11 Std bei durchschnittlich 19,5° gestanden hatten. — Schwabe (1950) kam dagegen bei *Chrysanthemum morifolium*, Sorte Sunbeam, zu einem abweichenden Ergebnis: Täglich 16 Std bei +0,8 bis 6,3° und Dunkelheit und 8 Std bei +20—25° und Licht waren ungefähr ebenso wirksam wie täglich 24 Std bei +0,8—7,2°, davon 8 Std bei Licht (die Behandlung erstreckte sich in beiden Fällen über 50 Tage). Nur in diesem letzten Fall könnte es sich um einen thermoperiodischen Effekt handeln, was im Hinblick auf die entwicklungsphysiologische Eigenart von *Chrysanthemum morifolium*, Sorte Sunbeam[2], nicht überraschen würde. Andererseits ist aber ein thermoperiodischer Effekt durch den geschilderten Versuch von Schwabe noch nicht hinreichend erwiesen, da die beiden Versuchsgruppen 800 bzw. 1200 Std lang der Kälte ausgesetzt waren, während ein maximaler Vernalisationseffekt bereits nach 500stündiger Kälteeinwirkung zu beobachten ist.

Bei diesem Stand der Kenntnisse erscheinen weitere Experimente wünschenswert. Über einen solchen Versuch soll im folgenden kurz berichtet werden.

2. Methodik

Der Versuch wurde mit Exemplaren einer zweijährigen Form von *Hyoscyamus niger*[3] vorgenommen. Die Aussaat erfolgte am 10. 8. 57. Bis zum 14. 10. wurden die Pflanzen anfangs in der Aussaatschale, später in Pikierschalen, schließlich einzeln in Töpfen von 7 cm Durchmesser bei natürlicher Tageslänge im Gewächshaus aufgezogen.

Am 14. 10. wurden die Pflanzen auf die verschiedenen Versuchsgruppen verteilt. Die kleinsten Pflanzen (Gruppe A_1) und die größten (Gruppe A_2) wurden nun 48 Tage bei +2—3° C und schwacher Beleuchtung vernalisiert. Eine andere Gruppe von Pflanzen (E) wurde 48 Tage hindurch täglich von 18^{45}—10^{45} Uhr der Kälte ausgesetzt, eine weitere (D) von 10^{45}—18^{45} Uhr. In der übrigen Zeit standen die Pflanzen der Gruppen D und E in einem Raum bei konstanter Temperatur (+20 ±1° C) und konstanter Beleuchtung (20 Philips-TL-F-40 W/33-Leuchtstofflampen pro 1,44 m² in 35 cm Höhe über den Pflanzen). Am 16. 10. um 18^{45} und am 17. 10. um 10^{45} Uhr unterblieb das Umstellen der Gruppen D und E;

[1] Aus einer jüngst bekannt gewordenen Arbeit von A. Markowski und K. Kloska [Studies on the development of wheat. II. Three years' pot and hot-house experiments on the development of the reproductive phase of winter wheat depending on the course of vernalization in natural autumn-winter conditions. Roczn. Nauk Roln., Ser. A, **77**, 1—38 (1957); Polnisch mit russ. u. engl. Zusammenfassung], geht hervor, daß bei grünen Pflanzen der Winterweizensorte Ostka Złotokłosa der Vernalisationsprozeß durch tägliche Temperaturschwankungen von mehr als 10° C gleichfalls nachteilig beeinflußt wird, wogegen eine im Durchschnitt etwas höhere, aber weniger schwankende Temperatur günstigere Wirkungen zeitigt.

[2] Vernalisationsbedürftige Kurztagpflanze, die nur bei Lichtmangel durch Hitze devernalisiert werden kann.

[3] Für die freundliche Überlassung von Saatgut (*ann*$^+$*ann*$^+$ *pall*$^+$*pall*$^+$) habe ich Herrn Prof. Dr. W. Menke zu danken.

im übrigen erfolgte es an folgenden Tagen zu abweichenden Zeiten: am 20. 10. um 19^{20} statt 18^{45}, am 27. 10. um 19^{30} statt 18^{45}, am 4. 11. um 11^{45} statt 10^{45}, am 6. 11. um 18^{10} statt 18^{45}, am 13. 11. um 18^{10} statt 18^{45}, am 15. 11. um 23^{00} statt 18^{45}, am 17. 11. um 12^{00} statt 10^{45} und um 20^{00} statt 18^{45}, am 27. 11. um 11^{45} statt 10^{45} und um 20^{30} statt 18^{45}, am 28. 11. um 19^{45} statt 18^{45}, am 29. 11. um 12^{00} statt 10^{45} und am 30. 11. um 11^{45} statt 10^{45}.

Innerhalb von 48 Tagen waren die Pflanzen der Gruppe D also insgesamt rund 17, die der Gruppe E rund 31 Tage lang der Kälte exponiert. Als zusätzliche Kontrollen zu diesen beiden Gruppen wurden zwei weitere vom 14. 10. ab 17 Tage (F) bzw. 31 Tage lang (G) ohne Unterbrechung vernalisiert. Nach Beendigung der Vernalisation bzw. der thermoperiodischen Behandlung gelangten alle Pflanzen in den erwähnten Konstanzraum und am 6. 12. ins Gewächshaus (Temperatur — außer 4.—10. 1. und 16./17. 1. — $>20^{0}$, nächtliches Zusatzlicht anfangs von 2 100 W-Schreibtischlampen, ab 10. 1. von einer Osram-500 W-Lampe in 70 cm Höhe). Am 15. 4. 58 wurde der Versuch beendet.

Protokolliert wurden bei jeder Pflanze:

1. das Datum des Schossens, d. h. des Tages, an dem der Beginn der Internodienstreckung zu erkennen war;

2. das Datum des Tages, an dem sich erstmals eine Blüte voll entfaltete (oft gingen ihr einige verkümmerte Blüten voraus);

3. die Ordnungszahl der ersten voll entfalteten Blüte.

3. Ergebnisse

Die Resultate sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Was zunächst das Alter der Pflanzen beim Schossen anlangt, so hat die Größe der Pflanzen bei Beginn der Kältebehandlung bemerkenswerterweise hierauf keinen Einfluß (Gruppen A_1 und A_2). Die kürzere Zeit vernalisierten Pflanzen wiesen durchweg ein höheres Schoßalter auf, und die Pflanzen der Gruppen D und F schoßten größtenteils überhaupt nicht. Wenn man beim Vergleich zwischen den Gruppen E (48 Tage lang täglich 16 Std Kälte) und G (31 Tage ununterbrochen vernalisiert) das Schoßalter — wie es wohl am sinnvollsten ist — vom 1. 12. 57 an rechnet, so ergibt sich für E ein um 22,7 Tage höherer Wert ($P \ll 0{,}0002$, Differenz also sehr gut gesichert). Selbst wenn man dem Schoßalter das Ende der Kältebehandlungen zugrunde legt, schneidet E im Vergleich zu G ungünstiger ab ($P = 0{,}05$). Erst recht ist der Vernalisationseffekt bei E (gemessen am Schoßalter) geringer als bei den 48 Tage ununterbrochen vernalisierten Gruppen A_1 und A_2 ($P < 0{,}0002$).

Die Entfaltung von Blüten wird — anders als das Schoßalter — sehr wohl durch den Entwicklungszustand der Pflanzen bei Vernalisationsbeginn mit beeinflußt, wie der Vergleich zwischen A_1 und A_2 lehrt ($P = 0{,}018$). — Im übrigen scheint die Blütenentfaltung durch den Übergang zu einer höheren Zusatzlicht-Intensität am 10. 1. 58 (s. o.) weitgehend synchronisiert worden zu sein. Diese Annahme macht es jedenfalls verständlich, daß die Pflanzen der meisten Versuchsgruppen,

auch wenn sie sich im Schoßalter signifikant unterschieden, doch annähernd zur gleichen Zeit zum ersten Mal eine Blüte öffneten (Blühalter, Spalte b, in Tabelle 1).

Tabelle 1. *Wirkung kontinuierlicher und täglich unterbrochener Kältebehandlungen auf Schossen und Blütenentfaltung bei Pflanzen einer zweijährigen Rasse von Hyoscyamus niger*

n_0 = Zahl der Pflanzen bei Beendigung der Kältebehandlungen; n' = Zahl der vor dem Schossen eingegangenen Pflanzen; n'' = Zahl der bei Versuchsschluß (15. 4. 58) noch nicht geschoßten Pflanzen; n_1 und n_2 = Zahl der jeweils ausgewerteten Pflanzen; n^- = Zahl der Pflanzen, die bei Versuchsschluß geschoßt waren, aber noch nicht blühten; $n^=$ = Zahl der zwischen Schossen und Blütenentfaltung eingegangenen Pflanzen.

	Kältedauer (Tage)	n_0	n'	n''	Schoßalter (Tage)				n^-	$n^=$	Zeit vom Schossen bis zum Blühen (Tage)			Blühalter (Tage)		Ordnungszahl der 1. offenen Blüte	
					n_1	ab Vern.-Ende $\bar{x}_1$	ab 1. 12. 57 $\bar{x}_2$	$\Sigma(\bar{x}-x)^2$			n_2	$\bar{y}$	$\Sigma(\bar{y}-y)^2$	$a = \bar{x}_1+\bar{y}$	$b = \bar{x}_2+\bar{y}$	$\bar{z}$	$\Sigma(\bar{z}-z)^2$
A_1	48 in 48	23	3	0	20	21,8	21,8	39	4	1	15	74,6	3330	96,4	96,4	1,9	8
A_2	48 in 48	22	1	0	21	21,3	21,3	182	0	1	20	58,9	7699	80,2	80,2	2,5	21
G	31 in 31	20	0	0	20	30,6	13,6	67	1	0	19	71,8	5579	102,4	85,4	5,0	105
E	31 in 48	35	0	0	35	36,3	36,3	5380	1	1	33	49,4	2543	85,7	85,7	3,1	54
F	17 in 17	15	0	14	1	52	21	—	0	0	1	90	—	142	111	4	—
D	17 in 48	33	1	28	4	65,8	65,8	871	1	0	3	39,3	35	105,1	105,1	5,7	13

Dieselbe Annahme wird — wenigstens im Hinblick auf einen Vergleich zwischen E und G ($P = 0{,}0005$) — auch durch die Feststellungen über die Ordnungszahl der ersten offenen Blüte unterstützt. Weitere Aufschlüsse sind den Beobachtungen über die Zahl verkümmerter Blüten offenbar nicht zu entnehmen.

4. Diskussion

Hyoscyamus-Pflanzen, die 48 Tage lang abwechsend 16 Std einer Temperatur von +2—3° C und 8 Std einer solchen von etwa 20° C ausgesetzt waren, schoßten später als gleichaltrige, die 31 oder 48 Tage lang ohne Unterbrechung vernalisiert worden waren. Es spricht daher nichts dafür, daß die Vernalisation bei *Hyoscyamus* durch eine gleich lange thermoperiodische Behandlung voll ersetzt werden könnte. Der Verdacht, daß die hier zuerst erwähnten Pflanzen durch die intermittierend gebotene Temperatur von 20° ein wenig devernalisiert worden seien, läßt sich freilich nicht ganz entkräften. Zwar wirkt selbst eine Temperatur von 22—24° C nach Lang und Melchers (1947) nicht devernalisierend — vielmehr bewirkt sie eine Stabilisierung des Vernalisationseffektes —; andererseits liegt die obere Grenze des Bereiches

der bei *Hyoscyamus* vernalisationswirksamen Temperatur nach LANG (1951) nahe bei 17°.

Unserem Ergebnis vergleichbar sind Befunde von GREGORY und PURVIS (1938), die angequollene Caryopsen des Petkuser Winterroggens in der Weise wechselnden Temperaturen aussetzten, daß auf 1, 2, 3 oder 6 Tage bei +1° C stets 1 Tag bei +20° C folgte und sich die 1°-Tage bei allen Versuchsgruppen zu 6 Wochen addierten. Der Vernalisationseffekt war dann um so größer, je länger die 1°-Perioden währten oder — mit anderen Worten — je seltener die 1°-Exposition durch einen 20°-Tag unterbrochen wurde.

Summary

Plants of a biennial strain of *Hyoscyamus niger* were either vernalized at a temperature of +2—3° C. for (F) 17, (G) 31 or (A) 48 days, or exposed to alternating temperatures (E: daily 16 hours at +2—3° and 8 hours at +20°; D: daily 8 hours at +2—3° and 16 hours at +20°) for a period of 48 days. The vernalizing effect, as revealed by the date of shooting, was greatest after treatment A; after treatment E it was even smaller than after treatment G, and very little after treatments F and D (majority of plants strictly vegetative at the end of the experiment). This result does not give any hint towards a connection between vernalization and thermoperiodism. — In contrast to the date of shooting, the date of opening the first flower depends, among others, upon the size of the plants at the start of the cold treatment.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft bin ich für vielseitige Unterstützung sehr zu Dank verpflichtet. Herrn Prof. Dr. E. BÜNNING möchte ich auch an dieser Stelle für wertvolle Anregungen danken.

Literatur

LANG, A.: Untersuchungen über das Kältebedürfnis von zweijährigem *Hyoscyamus niger*. Züchter **21**, 241—243 (1951). — LANG, A., u. G. MELCHERS: Vernalisation und Devernalisation bei einer zweijährigen Pflanze. Z. Naturforsch. **2b**, 444—449 (1947). — LAUER, E.: Über die Keimtemperatur von Ackerunkräutern und deren Einfluß auf die Zusammensetzung von Unkrautgesellschaften. Flora (Jena) **140**, 551—595 (1953). — RÖSSGER, W.: Niedere Anzuchttemperatur als Ursache der Schosserbildung bei Kohlrabi. Versuche über die Auslösung von Schosser und Prüfung der Kohlrabi-Sorten auf ihre Schoßneigung bei verschiedenen Anzucht- und Kulturtemperaturen. Züchter **17/18**, 121—146 (1947). — SCHWABE, W. W.: Factors controlling flowering in the *Chrysanthemum*. I. The effects of photoperiod and temporary chilling. J. exp. Bot. **1**, 329—343 (1950). — TETJUREV, V. A.: Über die Thermoperiodizität im Prozeß der Jarovisation des Winterweizens. Dokl. Akad. Nauk SSSR, N. S. **25**, 627—629 (1939). Zit. nach Ber. wiss. Biol. **54**, 464. — Über Thermoperiodismus bei Durchgang von Winterweizenpflanzen durch das Vernalisationsstadium. I. Bot. Ž. **25**, 505—513 (1940); Russisch mit dtsch. Zus.fass.; zit. nach Ber. wiss. Biol. **57**, 113.

Privatdozent Dr. KLAUS NAPP-ZINN, Botanisches Institut der Universität Köln, Köln-Lindenthal, Gyrhofstr. 15—17

Aufnahmebedingungen

Die Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören und wissenschaftlich Neues bringen. Arbeiten, die ausschließlich praktischen Zwecken dienen, scheiden aus.

Bei Arbeiten aus Instituten ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß er mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.

Das Manuskript muß leicht leserlich geschrieben und völlig druckfertig sein; andernfalls sind Verzögerungen im Erscheinen unvermeidlich. Korrekturen im Satz müssen auf das sachlich Notwendige beschränkt werden.

Für die Rechtschreibung ist die „Wissenschaftliche Rechtschreibung nach JANSEN" maßgebend, mit der die Schreibung der Termini im „Handwörterbuch der Naturwissenschaften" (Jena 1931—1934) im wesentlichen übereinstimmt. Wenn nötig, wird die Angleichung durch die Herausgeber bzw. durch die Druckerei vorgenommen.

Die Darstellung soll möglichst kurz sein. Ergebnisse dürfen nicht gleichzeitig in Tabellen- und Kurvenform dargestellt werden.

Die Abbildungen sind auf das Notwendigste zu beschränken, insbesondere die Reproduktion von Photographien. Einzelfiguren einer Abbildung sind, falls es sich um Vorlagen für Strichätzungen handelt, wenn möglich so zusammenzustellen, daß sie in *einem* Klischee bei gleicher Verkleinerung reproduziert werden können. Buchstaben u. a. sind mit Bleistift beizufügen.

Die Texte zu den Abbildungen sind auf eigenem Blatt gesammelt beizugeben.

Bei einleitenden Literaturbesprechungen soll möglichst auf zusammenfassende Darstellungen verwiesen und nur das zum unmittelbaren Verständnis Notwendige gebracht werden.

Der Arbeit ist eine Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse (höchstens 1 Seite) anzufügen, die in Deutsch oder Englisch oder Französisch abgefaßt sein kann.

Zu den Literaturverzeichnissen: Bei Zeitschriftenartikeln sollen der Titel sowie erste und letzte Seite angegeben werden. In den Titeln von Büchern aller Sprachen sollen, zur Kennzeichnung gegenüber Artikeln in Zeitschriften, Substantiva wie Adjektiva groß, dagegen in den Abkürzungen von Zeitschriftentiteln die Substantiva groß und die Adjektiva klein geschrieben werden (z. B. Cell Res., aber cell. Physiol.).

Die physiologische Uhr

Von Professor Dr. **Erwin Bünning,** Direktor des Botanischen Institutes Tübingen.

Mit 107 Abbildungen. VI, 105 Seiten Gr.-8°. 1958. Englische Broschur DM 24.—

Inhaltsübersicht: 1. Einleitung. — 2. Cyclische Prozesse als Prinzip der physiologischen Zeitmessung. — 3. Celluläre und zentrale Steuerung. — 4. Wirkung verschiedener Faktoren auf die physiologische Uhr. — 5. Die Rolle von Cytoplasma, Zellkern und Plastiden im Mechanismus der Uhr. — 6. Zusammenfassung zu einem Schema. — 7. Nutzung der Uhr durch die Organismen. — 8. Rückblick auf ein halbes Jahrhundert. — Literatur. — Namenverzeichnis. — Sachverzeichnis.

SPRINGER-VERLAG / BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Handbuch der Pflanzenphysiologie

Encyclopedia of Plant Physiology

Herausgegeben von **W. Ruhland**, Unterdeufstetten, in Gemeinschaft mit E. Ashby, J. Bonner, M. Geiger-Huber, W. O. James, A. Lang, D. Müller, M. G. Stålfelt. In 18 Bänden.

Soeben erschien:

Band X:

Der Stoffwechsel sekundärer Pflanzenstoffe

The Metabolism of Secondary Plant Products

Bearbeitet von B. Arreguín, C. E. Ballou, F. Blank, W. C. Evans, T. A. Geissman, T. W. Goodwin, A. J. Haagen-Smit, A. Heusner, J. G. Kisser, D. R. Kreger, H. Mader, W. Mayer, O. Moritz, F. F. Nord, P. Schwarze, S. Shibata, G. de Stevens. Redigiert von **K. Paech†** und **P. Schwarze.** Mit 57 Abbildungen. XV, 834 Seiten Gr.-8°. 1958. Ganzleinen DM 198.—

Bei Verpflichtung zur Abnahme des gesamten Handbuches Subskriptionspreis Ganzleinen DM 158.40

Inhaltübersicht: **Einführung.** — **Die Terpenoide.** Übersicht über Terpenoide. Die niederen Terpene (besonders ätherische Öle und Harze). Phytosterine. Carotenoids. Rubber and latex. — **Wachs, Cutin, Kork.** Wax. Cutin. Kork. — **Anthocyanins, flavones, xanthones.** — **Pflanzengerbstoffe.** — **Lignins and lignification.** — **Hydroaromatische Verbindung und weitere Benzolderivate.** Inositol and related compounds (cyclitols). Phenole, Chinone und die biogene Bildung von Benzolkernen. The metabolism of phenylpropane derivatives in plants. — **Especial compounds of lichens.** — Jeder Beitrag enthält ein Literaturverzeichnis. — Namenverzeichnis — Author Index. — Sachverzeichnis (Deutsch-Englisch). — Subject Index (English-German).

SPRINGER-VERLAG / BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg — Druck der Universitätsdruckerei H. Stürtz AG., Würzburg
Printed in Germany